

**Molekulare Analyse der Interaktion
der Disintegrin-Metalloproteinase ADAM15 mit
der Fokalen Adhäsionskinase und
dem Poly(A)-Binding Protein
in osteoarthrotischen Chondrozyten**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

DISSERTATION

von

Diplom-Biologin Dorothee Fried

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß
2. Referent: Prof. Dr. Gerhard Thiel
Externer Betreuer: Prof. Dr. Harald Burkhardt

Darmstadt 2017

Fried, Dorothee : Molekulare Analyse der Disintegrin-Metalloproteinase ADAM15 mit der Fokalen Adhäsionskinase und dem Poly(A)-Binding Protein in osteoarthrotischen Chondrozyten
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2018
URN:nbn:de:tuda-tuprints-72798
Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2017

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	VII
Summary.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Osteoarthritis.....	1
1.2 Disintegrin- und Metalloproteinase 15 (ADAM15)	4
1.2.1 Prodomäne der ADAMs	5
1.2.2 Metalloproteinase-Domäne der ADAMs	6
1.2.3 Disintegrindomäne der ADAMs	7
1.2.4 Cystein-reiche und EGF-ähnliche Domänen der ADAMs	8
1.2.5 Zytoplasmatische Domäne der ADAMs	8
1.2.6 Pathologische Bedeutung von ADAM15.....	10
1.2.6.1 Bedeutung von ADAM15 für neoplastischen Krankheiten	10
1.2.6.2 Bedeutung von ADAM15 für Osteoarthritis und andere nicht-neoplastische Krankheiten	12
1.3 Fokale Adhäsionskinase (FAK).....	14
1.4 <i>Poly(A)-Binding Protein 1</i> (PABP1).....	18
1.5 Zielsetzung	21
2 Methoden.....	23
2.1 Molekularbiologische Methoden	23
2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.1.1.1 Standard-PCR	23
2.1.1.2 Kolonie-PCR	24
2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.1.3 Klonierung.....	24
2.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterienstämme	25
2.1.5 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	25
2.2 Zellbiologische Methoden	26
2.2.1 Zellkultur von adhärenenten Zellen	26
2.2.2 Patientenmaterial und Kultivierung von primären Chondrozyten	26
2.2.3 Zellstimulation	27
2.2.3.1 Stimulation mit Camptothecin.....	27
2.2.3.2 Stimulation mit Interleukin 2	27
2.2.4 RNA-Interferenz	27
2.2.5 <i>Mammalian Two-Hybrid</i> (M2H).....	28
2.2.6 Re-Adhäsionsassay	29
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	30

2.3.1	Herstellen von Zelllysaten	30
2.3.2	SDS-PAGE	30
2.3.3	Western-Blot	31
2.3.4	Plasmamembranpräparation im Sucrose-Dichtegradienten.....	31
2.3.5	Biotinylierung und Kreuzvernetzung von Oberflächenproteinen	31
2.3.6	Nachweis von mRNA Translation mittels Puromycin	32
2.3.7	Proteinbindungsstudien.....	33
2.3.7.1	Ko-Immunpräzipitation	33
2.3.7.2	Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	33
2.3.7.3	<i>Pulldown</i> -Assay mit zwei rekombinanten Proteinen	34
2.3.7.4	<i>Dot Blot</i>	35
2.3.7.5	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>).....	35
2.4	Fluoreszenz-Färbung von Zellen	35
2.4.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	35
2.4.2	Durchflusszytometrie.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	ADAM15-Expression im Zellkulturmodell.....	38
3.2	Einfluss der Interaktion von ADAM15 und der Fokalen Adhäsionskinase auf die Signaltransduktion in OA-Chondrozyten	42
3.2.1	Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15 anhand von rekombinanten Proteinen	42
3.2.1.1	Expression von rekombinanten Domänen der Fokalen Adhäsionskinase ...	42
3.2.1.2	Bindung von ADAM15 an die FAK-Domäne 707-913 im <i>Dot Blot</i>	45
3.2.1.3	Bindung der FAK an ADAM15 im <i>Pulldown Assay</i>	46
3.2.2	<i>Mammalian Two-Hybrid</i> zur Untersuchung der Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15	47
3.2.3	Detektion der Ko-Lokalisation von ADAM15 und der Fokalen Adhäsionskinase	50
3.2.4	Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase nach Induktion von genotoxischem Stress	52
3.2.5	Signaltransduktion eines chimären IL2R α /ZytoADAM15 Konstrukts.....	54
3.3	Funktion der Bindung des <i>Poly(A)-Binding Proteins</i> an ADAM15 während der Zelladhäsion	55
3.3.1	Identifizierung von PABP als Bindungspartner von ADAM15 mittels MALDI..	55
3.3.2	Bestimmung der an ADAM15 bindenden Domäne des <i>Poly(A)-Binding Proteins</i>	56
3.3.2.1	Ko-Immunpräzipitation von PABP und ADAM15	56
3.3.2.2	ADAM15-PABP-Bindungsstudien anhand von rekombinanten Proteinen....	58
3.3.2.3	<i>Mammalian Two-Hybrid</i> -Assay zur Untersuchung der Bindung von PABP an ADAM15	62
3.3.3	Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP und Etablierung des Re-Adhäsions-Assays.....	65
3.3.4	Nachweis der membranständigen Interaktion von ADAM15 und PABP.....	68
3.3.5	Nachweis der Translation an der Plasmamembran als Folge der Re-Adhäsion mittels Immunfluoreszenzfärbung	72
3.3.6	Translation an der Plasmamembran in Abhängigkeit von ADAM15.....	75

4	Diskussion	79
4.1	Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15.....	80
4.1.1	Spezifische Bindungsdomäne der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15	80
4.1.2	Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase in Abhängigkeit von ADAM15.....	81
4.2	Bindung des <i>Poly(A)-Binding Proteins</i> (PABP) an ADAM15	86
4.2.1	Spezifische Bindungsdomäne von PABP an ADAM15	86
4.2.2	Proteinsynthese an der Plasmamembran in adhärierenden Zellen als Folge der Bindung von PABP an ADAM15.....	88
5	Anhang	94
5.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
5.2	Material	95
5.2.1	Oligonukleotide	95
5.2.2	Vektoren.....	96
5.2.1	Reaktionssysteme (Kits).....	96
5.2.2	Bakterienstämme	97
5.2.3	Zellen	97
5.2.4	Antikörper.....	97
5.2.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	98
5.2.6	Software.....	99
5.2.7	Reagenzien, Medien und Enzyme.....	99
5.2.8	SDS-Gel.....	101
5.3	Literaturverzeichnis	102
5.4	Danksagung	118
5.5	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	119
5.6	Lebenslauf.....	120
5.7	Ehrenwörtliche Erklärung.....	121

Zusammenfassung

ADAM15 (*A Disintegrin And Metalloproteinase 15*) ist ein aus mehreren Domänen bestehendes Transmembranprotein. Neben den extrazellulären Pro-, Metalloproteinase-, Disintegrin-, Cystein-reichen- und EGF-ähnlichen Domänen beinhaltet es auch eine zytoplasmatische Domäne. Die erhöhte Expression von ADAM15 ist assoziiert mit aggressiven Krebsformen, wie beispielsweise Brust- und Prostatakrebs. Darüber hinaus wird eine hohe Expression von ADAM15 in nicht-neoplastischen und entzündlichen Geweben, mit denen ein Umbau der extrazellulären Matrix einhergeht, wie zum Beispiel Osteoarthritis nachgewiesen. Die Funktion von ADAM15 im osteoarthrotischen Knorpel ist allerdings nicht destruktiv sondern homöostatisch, wie ein ADAM15-defizientes Mausmodell und mit ADAM15 transfizierte chondrozytäre Zellen, die eine höheren Apoptose-Resistenz aufwiesen, darlegten. ADAM15 ist fähig durch genotoxischen Stress induzierter Apoptose durch die Suppression der Aktivierung von Caspase-3 entgegenzuwirken. Eine Zelllinie, die das Plasmamembran-gebundene ADAM15 ohne zytoplasmatische Domäne exprimierte, hatte diese anti-apoptotische Fähigkeit verloren, was eine bedeutende Rolle der intrazellulären Domäne als ein Gerüst für die Rekrutierung von Signal-übermittelnden Kinasen vermuten ließ. Zusätzlich war die Frage der direkten molekularen Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 mit der Fokalen Adhäsionskinase (FAK), basierend auf dem bereits publizierten modulierenden Einfluss von ADAM15 auf die FAK-Signalwege, offen. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die spezifische Bindung der Linker-Region zwischen der Kinase- und FAT-Domäne der FAK an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 eindeutig mittels *Mammalian Two-Hybrid*-, *Pulldown*- und *Dot Blot*-Versuchen bewiesen werden. Desweiteren wurde eine erhöhte Phosphorylierung der FAK an den Tyrosinresten Y397, Y576 und Y861 nach der Induktion von genotoxischem Stress mittels Camptothecin in ADAM15-transfizierten T/C28a4 Chondrozyten detektiert. Die Hypothese, dass die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 ein sensiertes extrazelluläres Signal übermitteln kann und daraus folgend zu einer Erhöhung der FAK-Phosphorylierung führt, wurde mittels der IL-2-Stimulation von Zellen, die mit einem chimären Konstrukt bestehend aus der extrazellulären IL-2 Rezeptor-Untereinheit α und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 transfiziert waren, bestätigt. Als Folge der ADAM15-abhängigen FAK-Phosphorylierung kommt es zur Bildung eines aktivierten FAK-Src-Komplexes, der zur Aktivierung von Überlebens-Signalwegen führt. Die neu entdeckte gegen-regulatorische Antwort auf genotoxischen Stress ist nicht nur im chondrozytären Überlebens-Signalweg sondern auch potentiell für die Apoptose-Resistenz im neoplastischen Wachstum relevant.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Bindung der *Poly(A)-Binding Proteins* (PABP) an ADAM15 analysiert. Auf Grund der potentiellen Funktionen der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 bei pathophysiologischen Vorgängen, wie sie bei verschiedenen Splice-Varianten von ADAM15, die zu unterschiedlich metastatischem Zellverhalten führen, beobachtet werden, wurden weitere Interaktionspartner mittels MALDI-TOF gesucht. Dadurch wurde PABP als Bindungspartner identifiziert und in Ko-Immunpräzipitationsversuchen bestätigt. Mittels ELISA- und *Mammalian Two-Hybrid*-Versuchen wurde die spezifische Bindung der Prolin-reichen Linker Region zwischen RRM4 (*RNA Recognition Motive 4*) und C-terminaler PABC-Domäne von PABP an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 bewiesen. Die Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP an der Plasmamembran in OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten konnte allerdings nur während der Re-Adhäsion der Zellen beobachtet werden. Mittels des etablierten Re-Adhäsions-Assays ließ sich die von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 abhängige, temporäre Lokalisation von PABP an der Plasmamembran in ADAM15-transfizierten T/C28a4-Chondrozyten nachweisen. Da PABP als RNA-bindendes Protein an der Translationsregulation beteiligt ist, wurde die Translation an der Plasmamembran unter Verwendung von Puromycin und anti-Puromycin Antikörpern untersucht. Sowohl mit ADAM15 als auch mit PABP wurde die Translation in re-adhärierten OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten ko-lokal an der Plasmamembran detektiert. Weiterhin konnte die Abhängigkeit von ADAM15 dieser Translations-Lokalisation in ADAM15-transfizierten T/C28a4-Chondrozyten und ADAM15-herab-regulierten HeLa-Zellen bewiesen werden. Die subzelluläre Lokalisation von PABP und folglich der Translation könnte durch einen Verankerungsmechanismus an der Plasmamembran mittels ADAM15 hervorgerufen werden, resultierend in einer Bildung von Membranfortsätzen (Lamellipodien), die zur Adhäsion oder Migration der Zelle führen. Die Fähigkeit einer Zelle Lamellipodien zu bilden ist ein wichtiger Schritt der Metastasierungskaskade, auf welche die Expression von ADAM15 einen Einfluss haben könnte.

Summary

ADAM15 (*A Disintegrin And Metalloproteinase 15*) is a transmembrane protein consisting of multiple domains. Besides the extracellular pro-, metalloproteinase-, disintegrin-, cysteine-rich and EGF-like domains it also contains a cytoplasmic domain. The enhanced expression of ADAM15 is associated with aggressive forms of cancer like breast and prostate cancer. Furthermore a high expression of ADAM15 in non-neoplastic and inflammatory tissues is detected which is associated with the remodeling of extracellular matrix for example in osteoarthritis. But the function of ADAM15 in osteoarthritic cartilage is not destructive but rather homeostatic which has been shown in an ADAM15 deficient mouse model and ADAM15 transfected chondrocytic cells which had an increased apoptosis resistance. ADAM15 has the ability of reducing genotoxic stress induced apoptosis by suppressing the activation of caspase-3. A cell line which expressed the plasma membrane bound ADAM15 without the cytoplasmic domain had lost its anti-apoptotic function which suggests an important role of the intracellular domain as a scaffold for the recruitment of signal transducing kinases. Additionally the question of direct molecular interactions of the cytoplasmic domain of ADAM15 with the focal adhesion kinase (FAK) was raised based on the already published modulating effect of ADAM15 to FAK signaling pathways. Within the first part of this thesis a specific binding between the linker region of the FAK, which lies between its kinase and FAT domain, and the cytoplasmic domain of ADAM15 could be clearly demonstrated by using *Mammalian Two-Hybrid*, *Pulldown* and *Dot Blot* techniques. Furthermore an increased FAK phosphorylation at tyrosine residues Y397, Y576 and Y861 after induction of genotoxic stress by camptothecin in ADAM15 transfected T/C28a4 chondrocytes was detected. The hypothesis of the cytoplasmic domain of ADAM15 as transmitting extracellular signals and downstream leading to an increase of FAK phosphorylation was proved by IL-2 stimulation of cells that were transfected with a chimeric construct consisting of the extracellular IL-2 receptor subunit α and the cytoplasmic domain of ADAM15. As a consequence of the ADAM15 dependent FAK phosphorylation the FAK-Src complex becomes activated leading to the activation of survival signaling pathways. This newly discovered counter regulatory answer to genotoxic stress is not only relevant in the chondrocytic survival signaling pathway but also potentially relevant for the apoptosis resistance in neoplastic growth.

In the second part of this thesis the binding of the *Poly(A)-Binding Protein* (PABP) to ADAM15 was analyzed. Due to the potential function of the cytoplasmic domain of ADAM15 in pathophysiological processes, as they are observed in different splice variants of ADAM15

that lead to different metastatic behavior of the cell, further interaction partners were screened by using MALDI-TOF. Thereby PABP was identified as binding partner which was confirmed by co-immunoprecipitation experiments. By ELISA and *Mammalian Two-Hybrid* experiments the specific binding of the proline rich linker region between RRM4 and the C-terminal PABC domain of PABP and the cytoplasmic domain of ADAM15 was shown. The co-localization of ADAM15 and PABP at the plasma membrane of OA chondrocytes and K4IM synovial fibroblasts was only present during re-adhesion of the cells. Through the established re-adhesion assay a cytoplasmic domain of ADAM15 dependent, temporary localization of PABP at the plasma membrane in ADAM15 transfected T/C28a4 chondrocytes could be proved. Since PABP is involved in translation regulation as RNA binding protein, translation at the plasma membrane was analyzed using puromycin and anti-puromycin antibodies. Translation at the plasma membrane was detected co-local with ADAM15 as well as PABP in re-adhering OA chondrocytes and K4IM synovial fibroblasts. Furthermore the ADAM15 dependency of this translation localization in ADAM15-transfected T/C28a4 chondrocytes and ADAM15 down regulated HeLa cells was shown. The subcellular localization of PABP and downstream of the translation could be triggered by an anchoring mechanism at the plasma membrane through ADAM15 resulting in the formation of membrane protrusions (lamellipodia) which lead to adhesion or migration of the cell. The ability of a cell to form lamellipodia is an important step of the metastasis cascade which could be influenced by the expression of ADAM15.

1 Einleitung

1.1 Osteoarthrose

Osteoarthrose (OA) ist eine fortschreitende entzündlich degenerative Erkrankung der Gelenke, die bei Menschen im Erwachsenenalter mit einer deutlichen Prävalenz für Hüft-, Knie- und Handgelenksarthrose zu einer der häufigsten Gelenkerkrankungen zählt [1]. Die Inzidenz der Osteoarthrose steigt mit zunehmendem Alter an, wobei das Alter nur einen der Risikofaktoren an Osteoarthrose zu erkranken darstellt [2]. Einer der weiteren endogenen Faktoren zum Erwerb der Arthrose ist die genetische Prädisposition, wie beispielsweise in Zwillingsstudien festgestellt wurde [3]. Exogene Risikofaktoren wie Übergewicht, das sich vor allem auf die Entstehung einer Kniegelenksarthrose auswirkt, kommen hinzu [4].

Die Hauptsymptome der Osteoarthrose sind Schmerzen im Gelenk und die Einschränkung der Beweglichkeit [5]. Diese Symptome werden im Krankheitsmanagement zunächst über konservative Therapien wie Physiotherapie behandelt. Darauf folgende Behandlungen beinhalten die pharmakologische Schmerzlinderung und als letzte Therapieform wird eine operativer endoprothetischer Ersatz durchgeführt [6]. Diese verschiedenen Therapieformen bewirken allerdings keine Inhibition der strukturellen Degradation des Knorpels durch die Osteoarthrose oder die Umkehrung des Krankheitsverlaufs.

Das charakteristische pathologische Hauptmerkmal der Osteoarthrose ist der Verlust des hyalinen Gelenkknorpels, aber auch die Synovialmembran, der Knochen und die anliegenden Bänder unterliegen strukturellen, degenerativen Veränderungen [7, 8] (Abbildung 1).

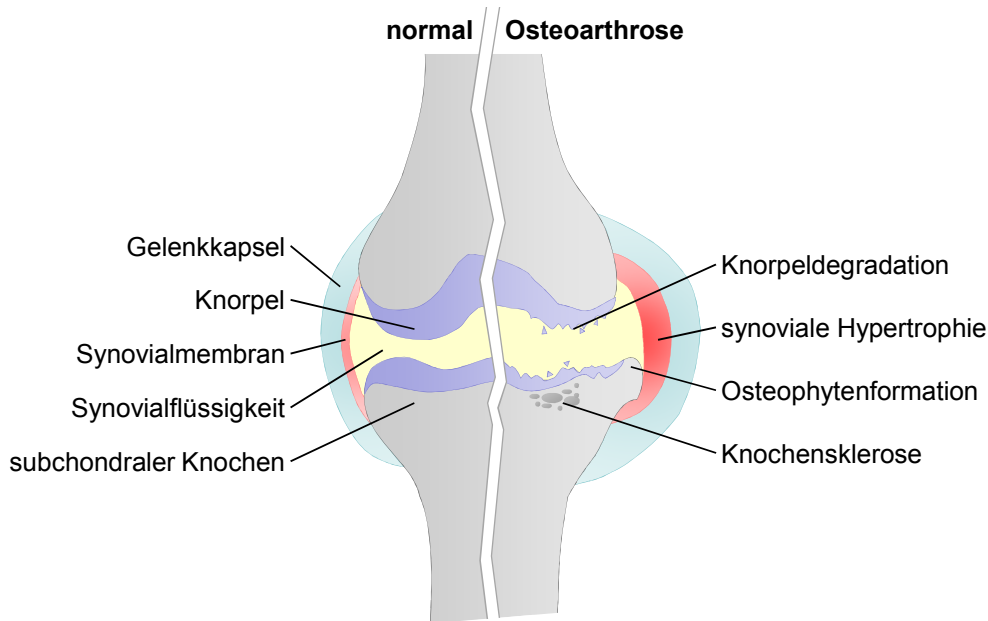


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines normalen und osteoarthrotischen Gelenks. Im gesunden Gelenk ist der intakte Knorpel schützend auf den knöchernen Gelenkflächen aufgelagert (links). Der zwischen den Gelenkflächen liegende Gelenkspalt wird von Synovialflüssigkeit ausgefüllt, die unter anderem die von der Synovialmembran produzierte Hyaluronsäure enthält. Das osteoarthrotische Gelenk hingegen ist durch Veränderungen in verschiedenen Geweben des Gelenks charakterisiert (rechts). Die Knorpelmatrix wird durch Kollagenasen und Aggrecanasen degradiert, was zur Fibrillation (feine Einrisse) und darauf folgend zum Verlust der Gelenkknorpeloberfläche führt. Die Synovialfibroblasten der Deckzellschicht werden hypertroph und Entzündungszellen infiltrieren die Synovialmembran. Der Umbau am Knochen führt zur Bildung von Osteophyten und zur subchondralen Sklerose des Knochens. Modifiziert nach Troeberg und Nagase (2012) [9].

Gesunder Knorpel unterliegt einem stetigen, dynamischen Auf- und Abbau der Knorpelmatrix, der durch anabol wirkende Faktoren wie Wachstumsfaktoren und katabol wirkende Faktoren wie Zytokine und Proteinasen gesteuert wird. Die Pathophysiologie der Osteoarthrose ist durch eine Verschiebung dieses Gleichgewichts gekennzeichnet [10]. Chondrozyten, die nur 2 % des Volumens des hyalinen Gelenkknorpels ausmachen [11], sind der einzige im Knorpel vorkommende Zelltyp, womit sie fast für das gesamte metabolische Fließgleichgewicht des Knorpels sorgen. Die extrazelluläre Matrix (EZM), welche die restlichen 98 % des Gelenkknorpels ausmacht, besteht aus Kollagenen und Proteoglykanen. Kollagen Typ II stellt dabei 80 % des Gesamtkollagens im hyalinen Knorpel dar und bildet durch seine tripelhelikale Form stabile Kollagenfibrillen, die durch ihr dichtes Netzwerk dem Knorpel hohe Druck- und Zugfestigkeit verleihen [12] (Abbildung 2). Die eingelagerten Proteoglykane erzeugen durch ihre Glykosaminglykan-Seitenketten einen hohen osmotischen Druck, wodurch Wasser in den Knorpel gezogen wird, was zu stoßdämpfenden, elastischen Eigenschaften führt [13].

Der Verlust der Knorpelmasse und die weiteren strukturellen Veränderungen des Gelenks während der Pathogenese der Osteoarthritis sind Folgen des Degradationsprozesses der Struktur-gebenden Moleküle der EZM und der Dedifferenzierung der Chondrozyten. Dabei kommt es in frühen Stadien der Osteoarthritis zur erhöhten Synthese von Matrixproteinen, was als Reparaturmechanismus interpretiert wird [14, 15, 16]. Zunächst werden vom Chondrozyten Kollagen Typ II und Aggrecan sezerniert, im weiteren Verlauf kommt es allerdings zur vermehrten Synthese von Kollagen Typ I und Typ III, die im gesunden Knorpel nicht bis gering exprimiert werden [17]. Diese Synthese von Knorpel-untypischen Kollagenen weist auf den Dedifferenzierungsvorgang der osteoarthrotischen Chondrozyten hin. Desweiteren werden schon in frühen Stadien der Osteoarthritis Matrix-degradierende Proteinase nachgewiesen. Dabei degradieren Metalloproteinase wie Aggrecanase (ADAMTS-4 und ADAMTS-5) und Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP-3) Aggrecan und Kollagenase wie MMP-13 Kollagen Typ II (Abbildung 2). Durch Matrix-Fragmente, die während der Degradation entstehen, kommt es zu einem *Feedback*-Mechanismus in den Chondrozyten und im Synovialgewebe, die daraufhin weitere proinflammatorische Proteine wie Zytokine, Chemokine und MMPs sezernieren [8]. Die Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) inhibieren die Synthese von Matrixproteinen und stimulieren die Sezernierung von MMPs [12]. Durch das Ungleichgewicht der anabolen und katabolen Prozesse kommt es zur Reduktion der extrazellulären Matrix und damit zum Verlust der Funktionalität des Knorpels und der Integrität des Gelenks.

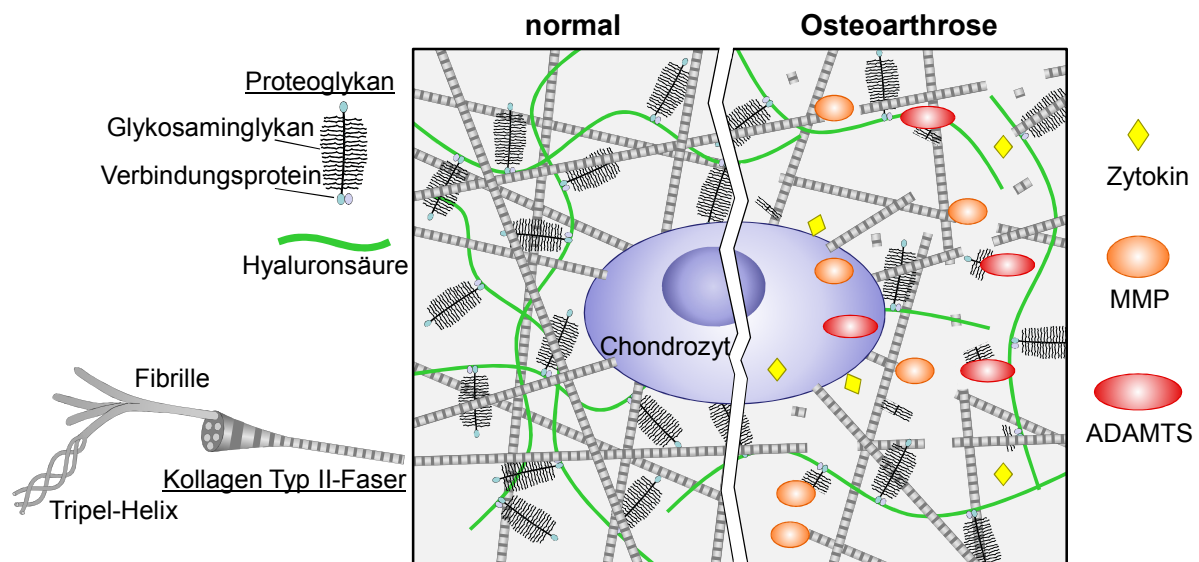


Abbildung 2: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der extrazellulären Matrix des normalen und osteoarthrotischen Knorpels. Die Zusammensetzung aus Kollagen-Fasern und Proteoglykanen verleiht dem Knorpel seine druckelastischen Eigenschaften (links). Während der Osteoarthritis (rechts) werden Matrix-Bestandteile durch Proteinase wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Aggrecanase (*A Disintegrin And Metalloproteinases with Thrombospondin Motive*

(ADAMTS)) degradiert, proinflammatorische Zytokine und Matrixfragmente stimulieren den Chondrozyten weitere Zytokine und Metalloproteinasen zu bilden.

Nach einer mechanischen Verletzung des Knorpels oder als Antwort auf Zytokine oder Matrix-Fragmente kommt es zur erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in den Chondrozyten, die zur Apoptose der Zellen führen können [18]. Allerdings ist die Apoptose-Rate von Chondrozyten im Vergleich zu deren signifikanten DNA-Schäden gering. Dies ist auf den prä- oder para-apoptotischen Phänotyp der Chondrozyten zurückzuführen, bei dem Apoptose-Induktoren herunter reguliert sind und der ein unkoordiniertes Genexpressionsmuster aufweist [19]. Jeder Zell-Verlust würde auf Grund der geringen Anzahl der Chondrozyten im Knorpel eine signifikante Störung der Gewebe-Homöostase darstellen.

Die Aufklärung der pathophysiologischen Prozesse im osteoarthrotischen Chondrozyten trägt zum Verständnis der Entstehung der Osteoarthritis und somit zur Entwicklung möglicher Therapien bei. Eine Möglichkeit dabei ist, Proteine, die in osteoarthrotischen Chondrozyten verstärkt exprimiert werden, auf ihre Funktion bei der Ätiopathogenese der Osteoarthritis zu untersuchen.

1.2 Disintegrin- und Metalloprotease 15 (ADAM15)

A *Disintegrin And Metalloprotease* 15 (ADAM15), welche nachweislich in osteoarthrotischen Chondrozyten erhöht exprimiert wird [20], ist ein membranständiges Glykoprotein, das wie auch die anderen Vertreter der ADAM-Familie aus mehreren Domänen aufgebaut ist [21, 22] (Abbildung 3). Die 35 bekannten ADAM-Vertreter werden in zahlreichen Spezies exprimiert [23] und haben dort unterschiedliche Funktionen.

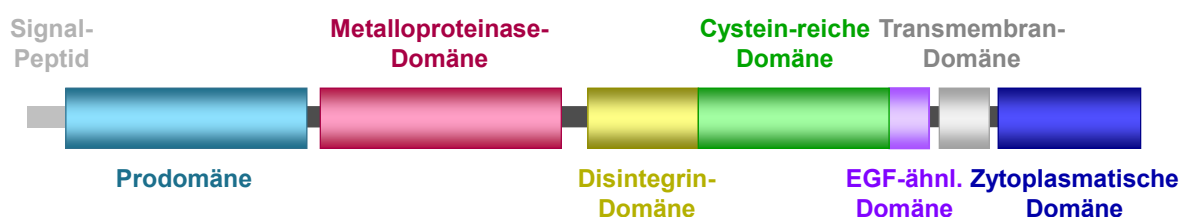


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Disintegrin-Metalloprotease ADAM15. Das Plasmamembran-ständige ADAM15 besteht aus der extrazellulären Prodomäne, Metalloprotease-Domäne, Disintegrin-Domäne, Cystein-reichen Domäne mit sich anschließender EGF-ähnlicher Domäne und der nach der Transmembrandomäne folgenden zytoplasmatischen Domäne.

ADAMs zählen wie auch die Proteinfamilie der löslichen ADAMTSs, die am C-Terminus zusätzlich Thrombospondinmotive enthalten, und die Proteinfamilie der löslichen *Snake*

Venome Metalloproteinases (SVMP), zur Familie der Reprolysine, auch Adamalysine genannt [24, 25, 26]. SVMPs, welche in Schlangengiften vorkommen, waren die ersten beschriebenen Disintegrin-Metalloproteinasen und haben auf Grund ihrer proteolytischen und Integrin-bindenden Eigenschaften eine hämorrhagische Wirkung [27]. Die Metalloproteinase degradiert dabei endotheliale Zellmembranproteine (z.B. Integrine) und Komponenten der Basalmembran (z.B. Fibronectin, Laminin, Kollagen Typ IV) während die Disintegrin-Domäne durch die Bindung an Integrine die Fibrinogenbindung und damit die Thrombozytenaggregation inhibiert [28].

Adamalysine gehören zusammen mit den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zur Superfamilie der Metzinkine, welche ein Zinkion im aktiven Zentrum der Metalloproteinase-Domäne enthalten. Das Zinkbindemotiv dieser Metalloproteinasen besteht aus drei das Zinkion komplexierenden Histidinresten, dem katalytischen Glutamat und einem unveränderlichen Methionin-Turn im aktiven Zentrum: HEXXHXXGXXH...M [29, 30].

1.2.1 Prodomäne der ADAMs

Neben der Metalloproteinase-Domäne sind die Proteine der ADAM-Familie noch aus weiteren funktionellen Domänen aufgebaut. Das Signalpeptid am N-Terminus wird während der Prozessierung im sekretorischen Pfad entfernt. Die darauf folgende Prodomäne inhibiert die Metalloproteinase-Aktivität durch die Interaktion eines Cysteinrests mit dem Zinkion [31].

Die maturierte, proteolytisch aktive Form der Metalloproteinase entsteht durch die Abspaltung der Prodomäne an einer Furinschnittstelle mittels einer Pro-Proteinkonvertase [32]. Der Großteil von maturiertem murinem ADAM15 befindet sich in intrazellulären Strukturen wie dem trans-Golgi Netzwerk oder endosomalen/lysosomalen Kompartimenten [33]. Diese zelluläre Verteilung konnte auch bei ADAM10 und ADAM17 beobachtet werden [34, 35]. Von ADAM15 wird vermehrt das komplette Protein an der Plasmamembran detektiert, wohingegen sich von ADAM17 nur die maturierte Form an der Plasmamembran nachweisen lässt. Die Verteilung der maturierten Formen und der Prodomäne-enhaltenden ADAMs deutet darauf hin, dass die Proteine vielfache Funktionen innerhalb und außerhalb der Zelle haben.

Neben der inhibitorischen Funktion auf die Metalloproteinase-Domäne hat die Prodomäne von ADAM15 einen pro-adhäsiven Effekt (Abbildung 4). So kann die rekombinant exprimierte Prodomäne von ADAM15 direkt an Kollagen Typ II binden [36]. Diese Bindung führt zu einer deutlich verstärkten Adhäsion von ADAM15-exprimierenden Chondrozyten auf Kollagen Typ II.

1.2.2 Metalloproteinase-Domäne der ADAMs

Bei 13 der 21 bekannten humanen ADAMs ist die Metalloproteinase-Domäne potentiell proteolytisch aktiv [22]. Die Hauptsubstrate der proteolytischen ADAMs sind Membran-gebundene Proteine, zu denen vor allem Liganden von TNF- α -Rezeptor und Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGF (*Epidermal Growth Factor*)-Rezeptor zählen.

Ein gut untersuchtes Beispiel für dieses *Ectodomain Shedding* ist ADAM17 (TACE, *Tumor necrosis factor- α Converting Enzyme*), welches unter anderem die membranständige Proform des proinflammatorischen Zytokins TNF- α abspaltet [37]. Das Substratspektrum von ADAM17 beinhaltet weiterhin die Membran-gebundenen Faktoren TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*), Amphiregulin, Epiregulin und Heparin-bindendes EGF, welche an den EGF-Rezeptor binden und zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege führen [38, 39]. ADAM17 wird in den Zellen verschiedener Krebsarten verstärkt exprimiert und führt dadurch zu zellulären Reaktionen wie Proliferation und Überleben. Eindeutige Hinweise darauf geben zahlreiche Studien wie beispielsweise eine Untersuchung von Brustkrebszellen, deren Wachstum *in vitro* durch die Inhibition von ADAM17 reduziert wurde [40].

Auch ADAM10 prozessiert Liganden des EGF-Rezeptors, wie EGF und Betacellulin [38], und stellt einen weiteren Hauptregulator in Zelladhäsion, Migration, Entzündung und Krebs dar. Wie von Maretzky *et al.* 2005 gezeigt, schneidet ADAM10 die extrazelluläre Domäne des Adhäsionsproteins E-Cadherin, was folglich zu einer verstärkten Proliferation führt [41]. E-Cadherin kommt in Zell-Zell-Kontakten in den sogenannten *Adherence Junctions* vor, die bei der embryonalen Entwicklung, Gewebeintegrität und Wundheilung eine Funktion haben [42]. Weiterhin führt die Bildung von Zell-Zell-Kontakten durch E-Cadherin zu einer Inhibition der metastatischen Fähigkeit von Krebszellen [43].

Auch von ADAM15 wurde in einer Brustkrebszelllinie Sheddase-Aktivität der Metalloproteinase-Domäne beobachtet, durch die ein lösliches E-Cadherin-Fragment freigesetzt wird [44]. Die Studie zeigte, dass ADAM15 *in vitro* E-Cadherin schneidet und bei einer ADAM15-Überexpression in Brustkrebszellen nach der Stimulation durch Serumentzug zur erhöhten Freisetzung von löslichem E-Cadherin-Fragment führt. Dieses Fragment bindet an den Rezeptor HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), welcher wie der EGF-Rezeptor (HER1) zur Familie der ErbB-Rezeptoren gehört, und führt zur Stabilisierung des HER2/HER3 Heterodimers. Daraufhin werden Erk-abhängige Signalwege induziert, die zu einer verstärkten Migration und Proliferation der Zellen führen [45].

Neben der proteolytischen Aktivität als Sheddase, die zur Freisetzung von Rezeptor-Liganden und dem Shedding von Adhäsionsmolekülen führt, können einige Mitgliedern der ADAM-Familie eine Funktion als Matrix-degradierende Proteinase ausüben. Allerdings ist die Matrix-degradierende Aktivität bei ADAMs nicht so weit verbreitet wie bei anderen

Mitgliedern der Metzinkin-Familie, wie MMPs und ADAMTSs. Bei ADAM10 wurde *in vitro* die Degradation von Kollagen Typ IV nachgewiesen [46]. Das in dieser Studie aus bovinen Nierenzellen stammende ADAM10 könnte deshalb eine Funktion bei pathologischen Vorgängen haben, bei denen die Degradation der Basalmembran involviert ist, wie beispielsweise bei der Metastasierung von Krebszellen. Von Martin *et al.* 2002 wurde bei *in vitro*-Versuchen die Kollagen-degradierende Aktivität von ADAM15 beobachtet [47] (Abbildung 4). Das aus humanen Mesangiumzellen (HMCs, *Human Mesangial Cells*) isolierte ADAM15 degradierte das in der Basalmembran vorkommende Kollagen Typ IV und Gelatine (denaturiertes Kollagen Typ I), was die Migration der HMCs in der Mesangium-Matrix vereinfachen und fördern könnte.

1.2.3 Disintegrindomäne der ADAMs

Die auf die Metalloproteinase-Domäne folgende Disintegrindomäne enthält 6-15 Cysteinreste die durch Disulfidbrücken verbunden sind und so zur Bildung eines *loops* führen. Am Ende des *loops* befindet sich ein Peptidmotiv, welches potentiell Integrine bindet, wodurch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte beeinflusst werden [48, 49].

Integrine sind eine Proteinfamilie transmembran verankerter Adhäsionsproteine, die an der Zelladhäsion, Migration und Signaltransduktion beteiligt sind [50]. Die aus den Untereinheiten α und β aufgebauten Integrine binden extrazellulär vorwiegend Matrixproteine. Über ihre zytoplasmatische Domäne interagieren Integrine mit zytoskelettalen Proteinen, zytoplasmatischen Kinasen und Adapterproteinen, die zusammen einen fokalen Adhäsionskomplex bilden. Somit stellen Integrine eine Verbindung zwischen der äußeren Umgebung und dem Inneren der Zelle her, durch die mechanische Kräfte sowie biochemische Signale übertragen werden.

Humanes ADAM15 enthält in seiner Disintegrindomäne das in anderen ADAMs nicht vorkommende Tripeptidmotiv RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), über das eine Interaktion mit $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_5\beta_1$ -Integrin entsteht [51, 52]. Dieses Motiv ist auch in ADAM15 anderer Spezies nicht konserviert, bei murinem ADAM15 enthält das Disintegrin die Sequenz TDD anstelle von RGD. Übereinstimmend mit humanem ADAM15 ist allerdings die Disintegrindomäne einiger SVMPs, die ebenfalls das RGD-Motiv enthalten [28]. Die aus Schlangengiften stammenden löslichen Disintegrin-Metalloproteinasen inhibieren durch ihre Bindung an Integrine auf der Zelloberfläche von Thrombozyten die Blutgerinnung, da sie mit Fibrinogen und Matrixproteinen um die Integrinbindung konkurrieren. Matrixproteine wie Vitronektin enthalten ebenfalls ein RGD-Motiv, welches unter anderem an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet [53]. Somit steht auch die Disintegrindomäne von ADAM15 in Konkurrenz zu Matrixproteinen um die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.

Die Wechselwirkung von ADAMs mit Integrinen führt zu einem veränderten Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zellen bei neoplastischen Krankheiten einschließlich Metastasierung und Neovaskularisierung [54]. Allerdings ist der Zusammenhang zwischen der Expression von ADAM15 und dem Migrationsverhalten der Zelle nicht immer positiv korrelierend, da die Überexpression von ADAM15 bei einigen Zelltypen zu verstärkter, bei anderen hingegen zu verminderter Migration bzw. Metastasierung führt [55, 56, 57, 58, 59, 60]. Hierbei könnte von Bedeutung sein, ob die Interaktion von ADAM15 mit Integrinen in *cis* oder *trans* erfolgt. Eine Bindung von Integrinen an ADAM15 auf der Zelloberfläche in *cis* könnte zu einer Reduktion der Matrixadhäsion führen. Dies kann sowohl zu verstärkter als auch zu reduzierter Migration führen, die auf dem gerichteten Adhären und Ablösen der Zelle beruht. Eine Bindung von ADAM15 an Integrine der Zelloberfläche einer benachbarten Zelle in *trans* könnte zu einer Verstärkung der Zell-Zell-Kontakte führen würde, welche die Migration einzelner Zellen inhibieren würde.

1.2.4 Cystein-reiche und EGF-ähnliche Domänen der ADAMs

Eine weitere Domäne der ADAM-Proteinfamilie mit adhäsiven Eigenschaften ist die Cystein-reiche Domäne, die bei ADAM12 die Zelladhäsion über die Bindung an Fibronectin oder die transmembran verankerten Syndecane unterstützt [61, 62]. Über die Funktion der sich anschließenden EGF-ähnlichen Domäne, an die sich wiederum die Transmembrandomäne anschließt, ist wenig bekannt.

1.2.5 Zytoplasmatische Domäne der ADAMs

Die am C-Terminus gelegene, zytoplasmatische Domäne der ADAMs folgt auf die Transmembrandomäne. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne ist im Gegensatz zu der anderer ADAM-Domänen innerhalb der Familie wenig konserviert und variiert in ihrer Länge von 40-250 Aminosäuren. Allerdings besitzen die zytoplasmatischen Domänen einiger ADAMs eine oder mehrere SH3(*Src homology 3*)-bindenden Motive, die aus dem Aminosäuremotiv PXXP bestehen. Während einige ADAMs keinen klassischen SH3-Domäne bindenden Bereich enthalten (z.B. ADAM28), enthalten andere Mitglieder der ADAM-Familie zwei (z.B. ADAM10, ADAM17) oder mehr PXXP-Motive (z.B. ADAM12) [63]. ADAM15 besitzt in seiner zytoplasmatischen Domäne zwei dieser Prolin-reichen Sequenzen (PPPPRKP und RPAPPPP). An diese SH3-bindenden Domänen können Proteine mit SH3-Domäne binden und zu einer Modulation der Lokalisation oder Regulation der Aktivität der ADAMs führen [64]. Zu Proteinen, die SH3-Domänen beinhalten und beispielsweise an die zytoplasmatische Domäne von ADAM12 binden, zählen unter anderem non-Rezeptor Tyrosinkinasen der Src-Familie wie c-Src und Yes, als auch Src-bindende Proteine wie Tks5, Grb2 und die regulatorische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), p85 α [65, 66,

67, 68]. Die Kinase Src reguliert zelluläre Prozesse, die Zellproliferation, Migration, Differenzierung und Überleben beinhalten [69, 70]. Src funktioniert dabei einerseits als Tyrosinkinase und phosphoryliert spezifische Tyrosinreste seiner Substrate, andererseits funktioniert Src als Adapter, indem es an seinen SH2- und SH3-Domänen Proteine bindet und somit molekulare Komplexe um seine Kinase-Aktivität bildet. Durch die Bindung von c-Src an die zytoplasmatische Domäne von ADAM12 kommt es zu einer subzellulären Umverteilung von ADAM12 und einer Aktivierung von c-Src in Fokalkontakten [71]. Auch die Bindung der *Integrin-linked kinase* (ILK) an die zytoplasmatische Domäne von ADAM12 führt nach Stimulation mit Kollagen Typ I zu einer Umverteilung beider Proteine in Fokalkontakte [72].

Die Bindung von verschiedenen Interaktionspartnern an die zytoplasmatische Domäne kann sich bei ADAM15 durch die Expression verschiedener Splice-Varianten ändern. Die Splice-Varianten unterscheiden sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne und binden verschiedene SH3-Domäne beinhaltende Proteine wie Nck, Src und Brk in unterschiedlicher Intensität [56]. Beispielsweise wird Src von den Isoformen 3 und 6 gut gebunden, von Isoform 2 hingegen nur schwach. Dadurch könnte die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 je nach Expressionsform unterschiedliche Einflüsse auf zelluläre Funktionen wie Migration und Überleben haben (Abbildung 4).

Ein weiterer beschriebener Effekt der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 ist die Modulation der Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) durch die Adhäsion von Chondrozyten auf Kollagen Typ II [36]. Die FAK ist sowohl aus einer chondrozytären Zelllinie als auch aus osteoarthrotischen primären Chondrozyten mit ADAM15 präzipitierbar, was zumindest ihre Organisation im selben Proteinkomplex nahelegt (siehe auch 1.2.6.2).

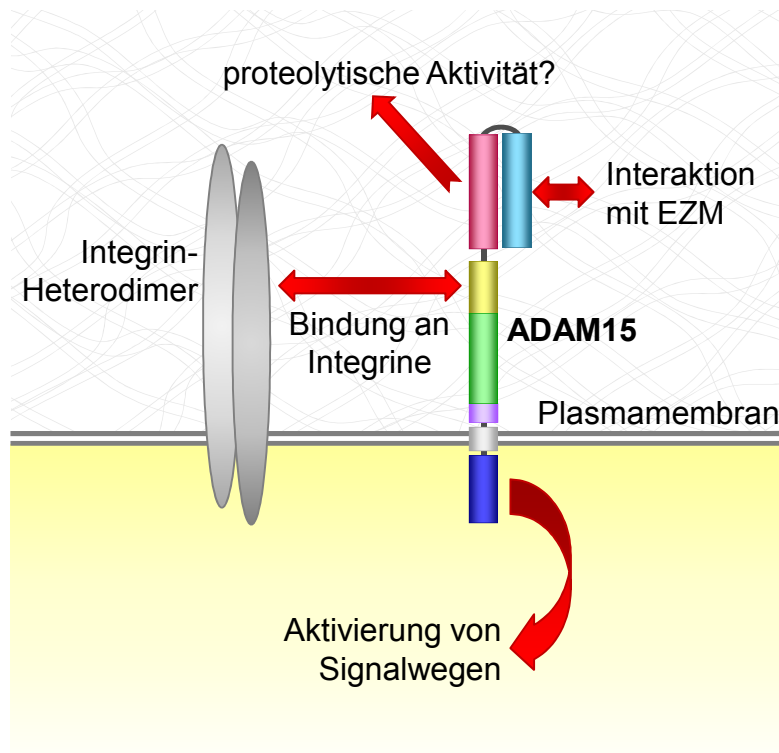


Abbildung 4: Multifunktionalität von ADAM15. Durch seine verschiedenen Domänen kann ADAM15 potentiell verschiedene Funktionen in der Zelle übernehmen. Die Prodomäne verstärkt die Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix (EZM). Weitere adhäsive Funktionen im Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt hat ADAM15 über die Bindung der Disintegrin-Domäne an Integrine in *cis* oder *trans*. Die potentiell proteolytische Aktivität der Metalloprotease-Domäne konnte bisher nur *in vitro* mit Kollagen Typ IV und denaturiertem Kollagen Typ I und als Sheddase für E-Cadherin gezeigt werden. Die zytosolische Domäne von ADAM15 kann mittels ihrer Interaktion mit intrazellulären Proteinen zur Aktivierung von anti-apoptotischen und/oder pro-metastatischen Signalwegen führen.

1.2.6 Pathologische Bedeutung von ADAM15

1.2.6.1 Bedeutung von ADAM15 für neoplastischen Krankheiten

Auf Grund ihrer verschiedenen funktionellen Domänen können ADAMs über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Krebs und Metastasen haben. Dabei könnten sowohl die proteolytische Aktivität als Metalloprotease, die Integrin-abhängigen Funktionen über die Disintegrin-Domäne als auch durch die zytosolische Domäne vermittelte Funktionen wie die Ansteuerung intrazellulärer Signalwege durch verschiedene Bindungspartner eine Rolle spielen.

Das erstmals 1996 in einer Mammakarzinomzelllinie entdeckte ADAM15 [73] wird in normalem, gesundem Gewebe nicht oder schwach exprimiert, wohingegen eine hohe Expression von ADAM15 in vielen neoplastischen und entzündlichen Geweben nachgewiesen werden kann.

Die Expression von ADAM15 wird mit der Malignität von einigen Tumoren in Verbindung gebracht. Wenn Tumorzellen die Fähigkeit erlangen in Gewebe einzudringen und im Körper zu metastasieren, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit an einem Rezidiv zu erkranken und die Prognose für den Patienten verschlechtert sich, denn mehr als 90 % der durch Krebs induzierten Sterbefälle sind auf Metastasen zurückzuführen [74].

ADAM15 trägt zur Progression von aggressiven Formen des Brust- und Prostatakrebs und zur Neovaskularisierung bei [44, 57, 75, 76]. Auch die erhöhte Expression anderer ADAMs führt zu verstärkter Metastasierung und verstärktem Tumorwachstum, wobei das erhöhte Expressions-Niveau der ADAMs in verschiedenen Adenokarzinomen (Pankreas, Brust, Prostata) und im Plattenepithelkarzinom mit einer schlechteren Prognose für die Patienten in Zusammenhang gebracht werden kann [77, 78, 79, 80, 81, 82]. Durch ADAM10 kommt es auf Grund des Sheddings des Adhäsionsmoleküls L1 zur erhöhten Zellmigration bei Eierstock- und Gebärmutterkrebs [83]. Die Wirkung von ADAM17 als Sheddase von TNF- α führt zur Proliferation von Brustkrebszellen, wie durch die Inhibition der proteolytischen Aktivität von ADAM17 mittels Antikörpern in einer Zelllinie gezeigt werden konnte [78].

Die proteolytische Aktivität von ADAM15 als Sheddase von E-Cadherin führt zur verstärkten Proliferation und Migration von Brustkrebszellen [44]. Auch in einer Prostatakrebszelllinie hat die Expression von ADAM15 Effekte auf das Migrationsverhalten der Zellen, da sich bei einer Herabregulation von ADAM15 die Migration der Zellen reduziert und *in vivo* die Entstehung von Knochenmetastasen vermindert [57]. Das Expressions-Niveau von ADAM15 korreliert in vielen Adenokarzinomen mit dem Krebsstadium. Es könnte bei Prostatakrebs als Marker für einen aggressiven Subtyp angesehen werden, da es einen Zusammenhang zwischen der Expression von ADAM15 und der metastatischen Progression gibt [60]. Die Funktion von ADAM15 bei der pathologischen Neovaskularisierung wurde in einem ADAM15-defizienten Mausmodell mittels Hypoxie-induzierter proliferativer Retinopathie gezeigt, wobei die ADAM15-defizienten Mäuse eine stark reduzierte angiogenetische Antwort aufwiesen und es vermutlich als Folge der verminderten Angiogenese zur Bildung kleinerer Tumore nach der Injektion von Melanomzellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kam [75]. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht die katalytische Aktivität der Metalloproteinas-Domäne von ADAM15 zur Angiogenese beiträgt [84]. Vielmehr muss eine nicht-katalytische Funktion von ADAM15 eine Rolle spielen.

In Brustkrebszellen werden verschiedene Splice-Varianten von ADAM15 exprimiert, die sich in der Länge der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden [85]. Abhängig von der exprimierten Splice-Variante gibt es unterschiedliche Prognosen für den Krebsverlauf des Patienten. Die Expression der verschiedenen Isoformen in einer Brustkrebszelllinie wies Effekte auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten auf, was auf das unterschiedliche

Interaktionsverhalten der zytoplasmatischen Domänen von ADAM15 mit Tyrosinkinasen zurückgeführt wurde [56].

1.2.6.2 Bedeutung von ADAM15 für Osteoarthritis und andere nicht-neoplastische Krankheiten

Neben neoplastischen Geweben wird ADAM15 auch verstärkt in nicht-neoplastischen, entzündlichen Gewebe exprimiert, die bei chronischen Krankheiten vorkommen. Hierzu zählen chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Atherosklerose und Gelenkerkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis [20, 86, 87].

Bei der Entstehung der Atherosklerose führt die Expression von ADAM15 in Endothelzellen zu einer Hyperpermeabilität der endothelialen Barriere und erhöhter Monozyten-Transmigration. Dieser Effekt ist nicht auf die proteolytische Aktivität von ADAM15 zurückzuführen, sondern auf einen intrazellulären Signalweg, der durch die zytoplasmatische Domäne vermittelt wird [88, 89]. Auch bei der rheumatoiden Arthritis führt die erhöhte Expression von ADAM15 in der Synovialmembran durch die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zu veränderten Zelleigenschaften, was zu einer Apoptose-Resistenz der aggressiven, pro-inflammatorischen Synovialfibroblasten gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli führt [90, 87].

Eine weitere Gelenkerkrankung neben der rheumatoiden Arthritis, deren Pathogenese mit ADAM15 in Zusammenhang gebracht wird ist die Osteoarthritis. Die erhöhte Expression von ADAM15-mRNA in humanen osteoarthrotischen Chondrozyten wurde *in vivo* erstmals 1999 im Knorpel nachgewiesen [20]. Diese erhöhte Expression zeigte sich bereits im frühen Stadium der Osteoarthritis, da auch wenig degradierter Knorpel und unbelastete Knorpel-Bereiche um den degradierten Bereich herum im osteoarthrotischen Gelenk eine stark erhöhte ADAM15-Expression aufwiesen. Der Vergleich mit den ebenfalls im osteoarthrotischen Knorpel erhöht exprimierten Disintegrin-Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 [91, 92], welche proteolytisch aktiv sind und auf Grund ihrer Sheddase-Aktivität proinflammatorische Zytokine freisetzen, ließ die Hypothese zu, dass ADAM15 ebenfalls mittels der proteolytischen Aktivität seiner Metalloproteinase-Domäne am Umbau des Knorpels beteiligt sein könnte. Auch die Fähigkeit von ADAM15 das Kollagen Typ IV *in vitro* zu degradieren [47] unterstützte diese Annahme, dass ADAM15 andere Kollagene als Substrat haben könnte, wobei weitere und *in vivo* Nachweise über die Knorpel-Degradation durch ADAM15 bislang fehlen.

Die Hypothese über die destruktive Funktion von ADAM15 im osteoarthrotischen Knorpel wurde allerdings 2005 in einem ADAM15-defizienten Mausmodell widerlegt [93]. Die ADAM15^{-/-}-Mäuse entwickelten nach 12-14 Monaten eine signifikant stärkere Knorpel-

Degradation im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Dieses Phänomen ließ im Gegensatz zur bisherigen Annahme auf eine schützende Funktion von ADAM15 im Knorpel schließen. In weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe wurde durch die Überexpression von ADAM15 in einer chondrozytären Zelllinie eine verstärkte Adhäsion auf Kollagen Typ II und ein anti-apoptotischer Effekt bei Serumentzug gezeigt [36]. Der pro-adhäsive Effekt kann unter anderem auf die Interaktion der Prodomäne von ADAM15 mit Kollagen Typ II zurückgeführt werden. Die Interaktion mit der extrazellulären Matrix führt außerdem in Abhängigkeit von der zytoplasmatische Domäne von ADAM15 zu einer veränderten Phosphorylierung von Proteinen in der Zelle, was auf eine Beeinflussung von Signalwegen durch ADAM15 hindeutet.

Der anti-apoptotische Effekt von ADAM15 durch die Aktivierung überlebensfördernder Signalwege wurde in einem genotoxischen Stressmodell bestätigt [94]. Chondrozyten sind im osteoarthrotischen Knorpel erhöhtem genotoxischem Stress ausgesetzt, da sich durch den Verlust der extrazellulären Matrix die Exposition der Zellen für mechanischen Kräfte und Zytokine erhöht und darauf folgend die ROS-Produktion steigt [95, 96]. Im genotoxischen Stressmodell führt der Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin dazu, dass der Scherungsstress der DNA nicht mehr durch die Topoisomerase I gemindert werden kann und es zu Doppelstrangbrüchen kommt, was die Apoptose der Zelle zur Folge hat [97].

DNA-Schäden und apoptotische Chondrozyten sind ein Merkmal der Osteoarthritis, allerdings ist die Apoptoserate mit weniger als 1 % unerwartet gering [98]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Chondrozyten in einem prä-apoptotischen Phänotyp verbleiben [99]. Diesen Phänotyp zeichnet ein unkoordiniertes Genexpressionsmuster und eine herunter regulierte Expression von GTPase und RhoB aus, welche für die Apoptose-Induktion nach DNA-Schäden zuständig wären [19]. Da die post-mitotischen Chondrozyten keiner Seneszenz unterliegen, akkumulieren beschädigte Proteine, Lipide und DNA in den prä-apoptotischen Zelle, was zu einer Störung der normalen Zellfunktion führt bis die Zelle schließlich die Homöostase nicht mehr aufrecht erhalten kann [16].

Durch das genotoxischen Stressmodell mit Camptothecin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ADAM15 bei genotoxischem Stress zu einer erhöhten XIAP(*X-linked Inhibitor of Apoptosis*)-Expression und dadurch zur erhöhten Überlebensrate der Zellen führt [94]. XIAP inhibiert dabei das apoptotische Protein Caspase-3, welches Teil der Apoptose-Kaskade ist. Diese anti-apoptotische Reaktion auf genotoxischen Stress vermittelt durch ADAM15 kann zumindest teilweise erklären, warum das ADAM15-defiziente Mausmodell im Vergleich zum Wildtyp mehr Osteoarthritis entwickelte. Die Inhibition der Apoptose führt vermutlich dazu, dass die trotz des genotoxischen Stresses geschädigten Chondrozyten die Homöostase länger aufrecht erhalten können [100].

Allerdings konnte bislang nicht gezeigt werden, über welchen Mechanismus mögliche anti-apoptotische Signalwege durch ADAM15 vermittelt werden. Ein möglicher Interaktionspartner von ADAM15, der Signale in die Zelle weiter leitet, ist die Fokale Adhäsionskinase (FAK), die durch die Integration von Wachstumsfaktor-Rezeptor- und Integrin-Signalen zu Wachstum, Differenzierung und Überleben der Zelle führt [101, 102]. Wie bereits unter 1.2.5 erwähnt ist die FAK nachweislich mit ADAM15 aus osteoarthrotischen Zellen präzipitierbar, eine Adapter-vermittelte Bindung aber nicht ausschließbar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der FAK, die als Folge der Adhäsion auf Kollagen Typ II entsteht, durch die Expression von ADAM15 beeinflusst wird, wobei eine Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 besteht [36].

1.3 Fokale Adhäsionskinase (FAK)

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) ist eine ubiquitär exprimierte, Spezies-übergreifend hochkonservierte non-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die aus mehreren Domänen besteht [103]. Die N-terminale FERM-Domäne (*band 4.1*, *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*) ist durch einen flexiblen Linker mit einer Kinase-Domäne verbunden. An die Kinase-Domäne schließt sich ein unstrukturierter Prolin-reicher Linker an, der diese mit der C-terminalen FAT-Domäne (*Focal Adhesion Targeting Domain*) verbindet (Abbildung 5).

Die FERM-Domäne reguliert durch eine intramolekulare Interaktion die Aktivität der Kinase-Domäne [104]. In Kristallisationsstudien wurde die intramolekulare Bindung der FERM-Domäne an die Kinase-Domäne belegt. Dadurch inhibiert die FERM-Domäne die katalytische Aktivität der FAK durch die Blockierung der Autophosphorylierungsstelle an Tyrosinrest Y397. Erst durch das Clustern der FERM-Domäne mit Integrinen, wie β_1 -Integrin, oder mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem EGF-Rezeptor, wird die Blockierung der Autophosphorylierungsstelle Y397 aufgehoben [105, 106]. Durch das Binden der Integrine an die extrazelluläre Matrix kommt es zum Clustern der Integrine in Fokalkontakten und der Bildung von Multiproteinkomplexen um die zytoplasmatische Domäne der Integrine [50]. Diese Komplexe beinhalten auch die FAK, deren FERM-Domäne durch die Interaktion beispielsweise mit β -Integrinen räumlich verschoben wird und zu einer Konformationsänderung der FAK führt [107, 108], die somit autophosphoryliert werden kann.

Für die Autophosphorylierung der FAK ist eine Anreicherung der FAK-Proteine notwendig, da die Autophosphorylierung intermolekular erfolgt [109]. Es bilden sich dabei keine stabilen Homooligomere, erst die Anreicherung der FAK im juxtamembranen Raum durch die Rekrutierung in Fokalkontakte erleichtert die Autophosphorylierung [110].

Die Rekrutierung der FAK in Fokalkontakte erfolgt durch die Interaktion der FAT-Domäne mit Paxillin [111, 112]. Der Transport der FAK kann durch die *FAK-related non-kinase* (FRNK) oder das FRNK-ähnliche Protein, welches durch den Verdau der FAK durch Caspasen in der Linker-Region entsteht, inhibiert werden [113, 114]. Die Prolin-reiche Linker-Region zwischen der Kinase- und der FAT-Domäne enthält neben zwei Caspase-Schnittstellen bei den Aminosäuren 704 und 772 auch zwei SH3-bindende Domänen mit PXXP-Motiv und eine Phosphorylierungsstelle an Tyrosinrest Y861 [113, 115]. Weitere Phosphorylierungsstellen befinden sich in der FAT-Domäne an Tyrosinrest Y925 und in der Kinase-Domäne an Tyrosinrest Y576 und Y577.



Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Fokale Adhäsionskinase. Die Fokale Adhäsionskinase besteht aus den Domänen FERM (*band 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin*), Kinase und FAT (*Focal Adhesion Targeting*) und besitzt eine Autophosphorylierungsstelle am Tyrosinrest Y397 sowie weitere Phosphorylierungsstellen an den Tyrosinresten Y576, Y577, Y861 und Y925. In der Linker-Region zwischen Kinase- und FAT-Domäne befinden sich zwei SH3-bindende Domänen (PXXP) und zwei Caspase-Schnittstellen (rote Pfeilköpfe).

Nach der Aktivierung der FAK (Autophosphorylierung von Y397) durch die Integrin-vermittelte Zelladhäsion kann c-Src an die FAK binden und wird seinerseits durch die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y416 aktiviert (Abbildung 6). Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung der weiteren Tyrosinreste der FAK durch die aktivierte Src-Kinase, was zur vollen katalytischen Aktivität der FAK und damit zur Bindung verschiedener Liganden führt [116]. Je nach Ligand induziert der aktivierte Dual-Kinase-Komplex verschiedene intrazelluläre Signalwege und führt damit zu unterschiedlichen Effekten auf die Zelle, wie Motilität, Wachstum und der Auslösung von Überlebenssignalen in Adhäsions-abhängigen Zellen [117]. Eine FAK-Defizienz ist in Mäusen embryonisch letal, da FAK für die embryonale Angiogenese essentiell ist [118, 119]. Eine erhöhte FAK-Expression, die in vielen invasiven Tumoren von beispielsweise Brust- und Prostatakrebs nachgewiesen ist, trägt zu deren Malignität bei [120]. Dadurch wurde die FAK zum Ziel für die Entwicklung von anti-Krebs-Therapien in Form von FAK-Inhibitoren.

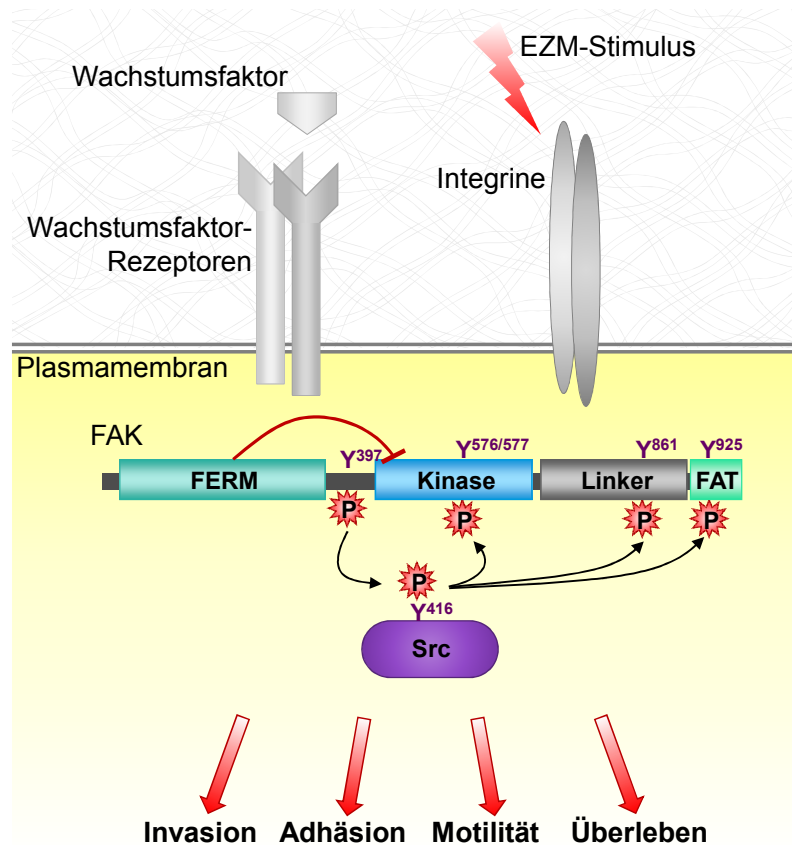


Abbildung 6: Aktivierungsmechanismus der Fokalen Adhäsionskinase. Die intramolekulare Bindung der FERM-Domäne an die Kinase-Domäne inhibiert die Aktivität der FAK. Durch das Clustern der FERM-Domäne mit Integrinen oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren als Folge von extrazellulären Stimuli kann der Tyrosinrest Y397 autophosphoryliert werden. Daraufhin aktiviert die FAK die Kinase Src, die wiederum die FAK an weiteren Tyrosinresten phosphoryliert und somit zu ihrer vollen katalytischen Aktivität führen kann. Durch die Bindung verschiedener Liganden kommt es zur Aktivierung von Signalwegen, die unterschiedliche zelluläre Reaktionen wie Invasion, Adhäsion, Motilität oder Überleben zur Folge haben.

Wie bereits erwähnt ist die Aktivierung der FAK Integrin-abhängig und kann zur Auslösung von anti-apoptotischen Signalwegen führen. Auch beim pro-adhäsive Effekt von ADAM15 in Chondrozyten auf Kollagen Typ II wurde eine Integrin-Abhängigkeit festgestellt, da die durch die Überexpression von ADAM15 verstärkte Adhäsion mittels anti-Integrin-Antikörpern inhibiert werden kann [93]. Weiterhin hat der pro-adhäsive Effekt von ADAM15 eine anti-apoptotische Wirkung, wobei die genaue Signalübermittlung in die Zelle noch ungeklärt ist. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen dem durch ADAM15 verstärkten Überleben und der FAK bestehen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Fokalen Adhäsionskinase und ADAM15 wurde erstmals durch Böhm *et al.* 2009 [36] beschrieben. Es konnte bisher mittels Ko-Präzipitation gezeigt werden, dass ADAM15 und die FAK ko-präzipitierbar sind und die Adhäsion von

Chondrozyten auf Kollagen Typ II durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 den Phosphorylierungszustand der FAK beeinflussen kann. Da die FAK zahlreiche Liganden hat und in Multiproteinkomplexen wie den fokalen Adhäsionskomplexen vorliegt, ist eine Bindung über ein Adapter-Protein nicht auszuschließen. Auch ein direkter Zusammenhang zwischen der anti-apoptotischen Wirkung von ADAM15 und der FAK wurde noch nicht experimentell hergestellt.

1.4 *Poly(A)-Binding Protein 1 (PABP1)*

PABPs sind ubiquitäre, meist zytoplasmatische Proteine, die in Hefen, Pflanzen und Metazoen, allerdings nicht in Prokaryoten exprimiert werden und deren Domänen hochkonserviert sind. Von den 7 bekannten humanen PABPs ist PABP1 das am besten untersuchte und auch Gegenstand dieser Doktorarbeit. Wie ADAM15 und die Fokale Adhäsionskinase kann PABP an der Plasmamembran lokalisiert nachgewiesen werden und stellt auf Grund der durchgeführten MALDI-Studie einen möglichen Interaktionspartner von ADAM15 dar.

PABPs haben die Eigenschaft den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA hochaffin zu binden (K_D 7 nM), wobei die minimale Bindesequenz 12 Adenosine beinhaltet und mehrere PABP-Moleküle parallel an den aus 200-250 Adenosinen bestehenden Poly(A)-Schwanz binden können [121, 122, 123].

Strukturell besteht PABP1 aus 4 RRM (*RNA Recognition Motives*), einer unstrukturierten, Prolin-reichen Linker-Region und einer C-terminalen Domäne (PABC) (Abbildung 7). RRM sind bei RNA-bindenden Proteinen verbreitete, 90-100 Aminosäuren lange Motive, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden. Die RRM1 und 2 von PABP1 binden Poly(A) mit hoher Affinität und haben darüber hinaus Bindestellen für verschiedene Proteine, wie Paxillin und Translationsinitiationsfaktoren [124]. Die RRM3 und 4 binden RNA mit weniger hoher Affinität als RRM1 und 2 [125]. Die Prolin-reiche Linker-Region ist weniger konserviert als die RRM-Domänen, scheint aber für die Homodimerisierung von PABP1 eine Funktion zu haben, wodurch möglicherweise die geordnete Bindung an Poly(A) vereinfacht wird [126, 127]. Die C-terminale PABC-Domäne ist eine Interaktions-Domäne für zahlreiche Liganden, die eine Rolle bei der Translationsregulation haben [128, 129, 130].

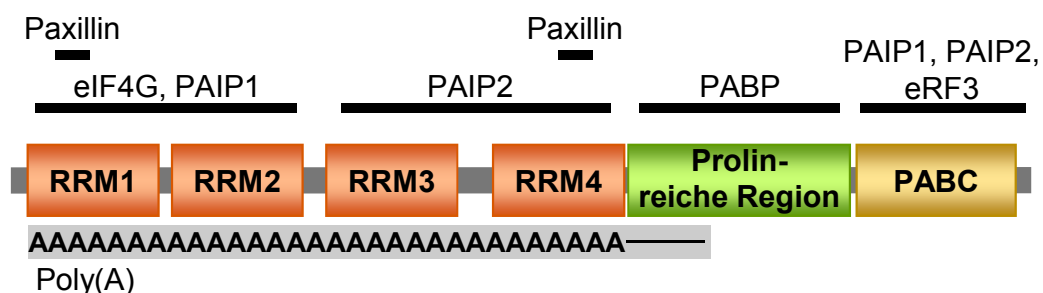


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des *Poly(A)-Binding Proteins (PABP1)*. Das Multidomänen-Protein PABP1 besteht N-terminal aus vier *RNA Recognition Motives* (RRM), welche an Poly(A) der mRNA (grau) binden können. Weiterhin können an diese Domänen der Translationsinitiationsfaktor eIF4G, das Translations-verstärkende *PABP-Interacting Protein 1* (PAIP1) und das Translations-schwächende PAIP2 binden. Auch zwei Paxillin-bindende Sub-Domänen sind in den RRM lokalisiert. Die folgende Prolin-reiche Linker-Region trägt vermutlich zur Dimerisierung von PABP1 bei der

Bindung an Poly(A) bei. Die C-terminale PABC-Domäne hat mehrere Liganden wie PAIP1, PAIP2 und *eukaryotic Release Factor 3* (eRF3), die zur Translations-Verstärkung, -Abschwächung bzw. -Termination führen können.

Wie die meisten RNA-bindenden Proteine ist PABP1 selbst nicht katalytisch, stellt aber einen Interaktionspartner für zahlreiche Faktoren, die an der Expression beteiligt sind, dar. PABP1 bindet an die mRNA von ihrer Synthese bis zu ihrer Degradation und ist währenddessen an mehreren Prozessen wie nukleärem Export, *nonsense mediated decay* (NMD), Translationsinitiation und Translationstermination beteiligt [129, 131, 132, 133]. Bei der Translationsinitiation führt die Bindung von PABP1 an Poly(A) zu einer 5' - 3' -Interaktion der mRNA, der sogenannten *closed-loop* Konformation, welche zur Rekrutierung der 40 S Untereinheit des Ribosoms führt, wodurch die Translation initiiert wird [134] (Abbildung 8). Dabei interagiert PABP1 mit seinen RRM1 und 2 einerseits mit Poly(A) der mRNA und andererseits mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G (*eukaryotic translation initiation factor 4 G*). Dieser ist Teil des eIF4F-Komplexes, welcher auch eIF4E beinhaltet. eIF4E bindet an das m⁷GpppG-Cap am 5'-Ende der mRNA und somit ist über die simultane Interaktion von Poly(A)-PABP1-eIF4G-eIF4E-Cap physikalisch eine zirkuläre Struktur entstanden, die im Rasterkraftmikroskop sichtbar ist [135].

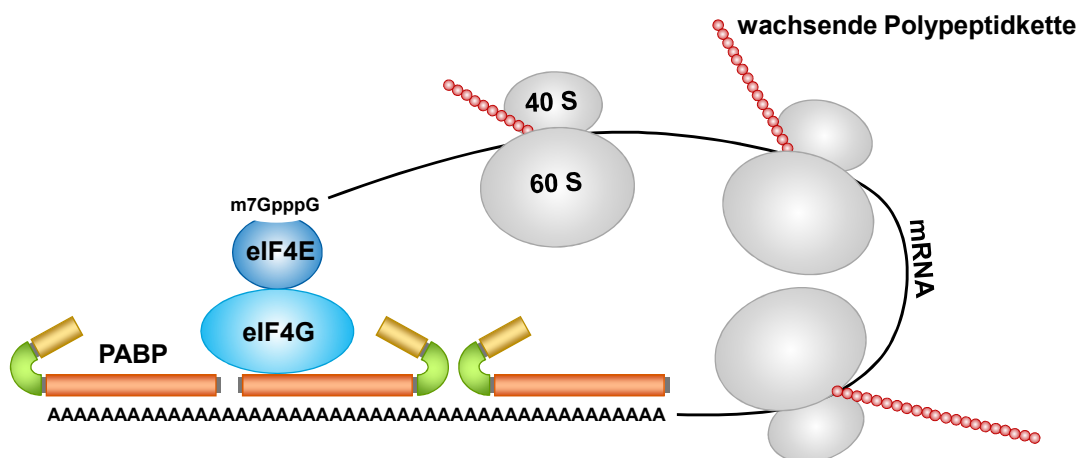


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der *closed-loop* Konformation während der Translation.

An den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA können mehrere PABP-Moleküle gleichzeitig binden. Zur Initiation der Translation bindet eIF4G an das an Poly(A) gebundene PABP in der RRM-Domäne und eIF4E bindet wiederum an das 5'-m⁷GpppG-Cap der mRNA und zusätzlich an eIF4G. An die so zirkularisierte mRNA wird die 40 S-Untereinheit und darauf folgend die 60 S-Untereinheit des Ribosoms rekrutiert, wodurch die Translation initialisiert ist.

Die Interaktion von PABP1 mit verschiedenen Bindungspartnern beeinflusst die Bindungsaffinität von PABP1 an Poly(A). So verstärkt die Bindung der RRM1 und 2 an eIF4G die Affinität zu Poly(A), wohingegen die Interaktion von PABP1 mit PAIP2 die Affinität

zu Poly(A) schwächt [136, 137]. Die Bindung der zahlreichen Liganden an PABP1 wird möglicherweise durch posttranslationale Modifikationen reguliert. So konnte in Pflanzen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von PABP zu einer verstärkten Bindung an Poly(A) führt [138]. Zu dem konnte in Vertebraten gezeigt werden, dass humanes PABP1 durch den p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)-Signalweg phosphoryliert werden kann [139]. PABP1 ist außerdem Substrat der CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*), welche Arginin in der Prolin-reichen Linker-Region methyliert [140], die Funktion der Methylierung ist allerdings noch unklar.

PABP1 und weitere an der Translation beteiligten Faktoren wie eIF4E und Ribosomen werden über ihre diffuse zytoplasmatische Verteilung hinaus auch an der Plasmamembran angereichert. Auch verschiedene mRNAs, deren Produkte zur Motilität und Adhäsion der Zelle führen, wurden an der Plasmamembran nachgewiesen und die aktive Translation in der Front des Leitsaums (*Leading Edge*) migrierender Fibroblasten gezeigt [141]. Die Translokation der mRNA erfolgt im Komplex mit mRNA-bindenden Proteinen, dem sogenannten Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), teilweise diffusiv und teilweise entlang des Zytoskeletts (Abbildung 9) [142]. Der Transport einiger mRNAs, wie zum Beispiel der β -Aktin-mRNA, in einen Plasmamembran-nahen Bereich wird durch ein Bindemotiv, welches oftmals in der 3'-UTR (*3'-untranslated region*) der mRNA liegt, und der Bindung spezieller RNA-bindender Proteine gesteigert [143].

Ob und wie mRNAs und die daran gebundenen Proteine an der Plasmamembran zeitlich verweilen, um dort die Translation zu vollziehen, ist bislang noch nicht ganz aufgeklärt. Ein Zusammenhang mit dem Plasmamembran-ständigen ADAM15 wäre hierbei denkbar. Die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 bietet durch ihre Fähigkeit mit zytoplasmatischen Proteinen zu interagieren die Voraussetzung für eine Anreicherung mRNA-assoziiierter Proteine wie PABP.

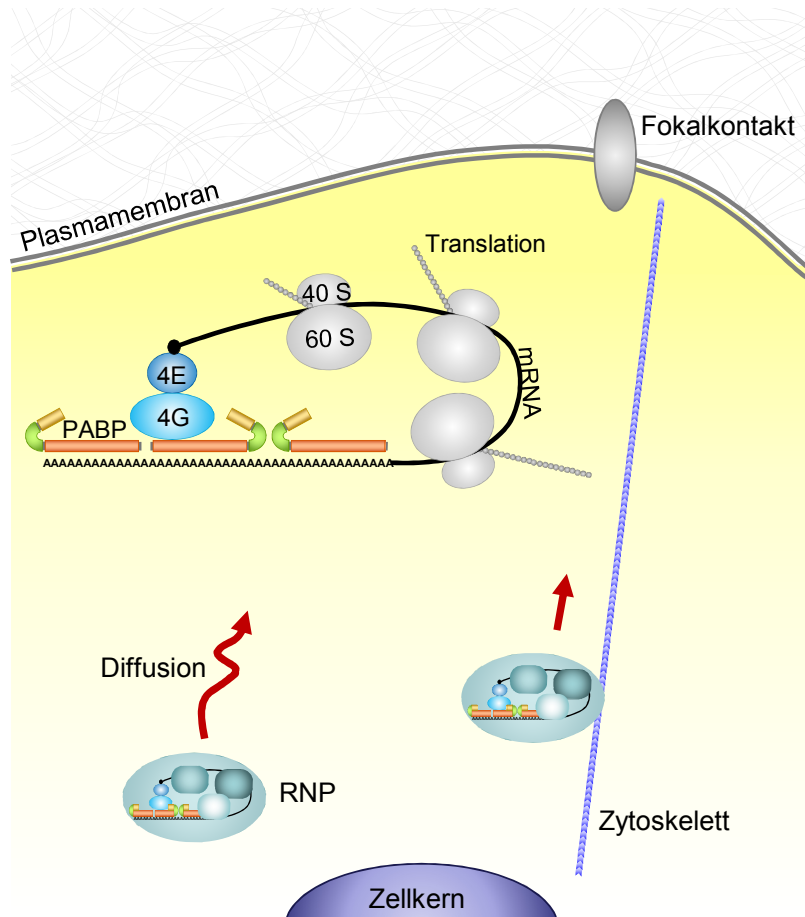


Abbildung 9: Vereinfachte schematische Darstellung der Translation an der Plasmamembran.

Die mRNA wird gebunden in Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) entlang des Zytoskeletts oder diffusiv zu subzellulären Kompartimenten wie Lamellipodien transloziert. mRNAs verschiedener Proteine, die eine Funktion für die Adhäsion oder Migration der Zelle haben, werden dort translatiert. Im Translationskomplex zusammen mit den Translationsinitiationsfaktoren und Ribosomen ist PABP auch im Lamellipodium an die mRNA gebunden. Die Expression der verschiedenen Proteine und der Bildung der Lamellipodien führt zur gerichteten Bewegung der Zelle.

1.5 Zielsetzung

ADAM15 wird in vielen entzündlichen, degenerativen oder neoplastischen Geweben wie osteoarthrotischem Knorpel und metastasierenden Tumoren erhöht exprimiert. In Chondrozyten hat ADAM15 einen vor Apoptose schützenden Effekt auf die Zellen, wobei der genaue Signalmechanismus, der von ADAM15 ausgeht, noch nicht aufgeklärt ist. Die anti-apoptotische Wirkung von ADAM15 kann auch eine Funktion in der Entstehung und Progression von Krebs haben. Neben der mit ADAM15 assoziierten Apoptose-Resistenz kommt hinzu, dass ADAM15 oft mit der erhöhten Aggressivität von Tumoren in Verbindung gebracht wird, was auf ein verstärktes Migrationsverhalten der Zellen zurückzuführen sein kann. Ob das veränderte Migrationsverhalten nur auf intrazelluläre Signalwege, die durch

ADAM15 aktiviert werden, oder auf mögliche andere Faktoren zurückzuführen ist, ist bislang noch unklar.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15 zu spezifizieren. Die FAK, welche auch eine Funktion als anti-apoptotischer Faktor hat, ist mit ADAM15 aus osteoarthrotischen Chondrozyten ko-präzipitierbar, aber noch nicht als direkter Bindungspartner nachgewiesen. Der Nachweis der direkten Bindung der FAK an ADAM15 und die Definition der eigentlichen Bindungsdomäne der FAK sind daher Ziele dieser Arbeit. Desweiteren soll die Frage geklärt werden, ob eine Aktivierung der FAK durch die Bindung an ADAM15 als Reaktion auf genotoxischen Stress in Chondrozyten erfolgt, wodurch FAK-assoziierte intrazelluläre Signalwege aktiviert werden könnten. Durch eine solche Reaktion könnten Rückschlüsse über die Funktion der ADAM15-Expression im osteoarthrotischen Chondrozyten und in anderen Krankheiten gezogen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Bindung des *Poly(A)-Binding Proteins* an ADAM15 als intrazellulärer Interaktionspartner. Die Bindung von PABP1 an ADAM15 wurde bisher noch nicht beschrieben und wirft Fragen über die Funktion einer Interaktion zwischen einem an der Translation beteiligten und einem Plasmamembranständigen Protein auf. Zunächst sollte daher die spezifische Bindedomäne von PABP1 an ADAM15 definiert werden. Die Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP1 ist für die *in vivo*-Bindung der beiden Proteine aneinander Voraussetzung und falls es zu einer Ko-Lokalisation an der Plasmamembran kommt stellt sich die Frage, ob es dort auch zur Translation auf Grund der mRNA-bindenden Eigenschaften von PABP1 kommt. Daher sollte der Einfluss von ADAM15 auf die Lokalisation der Translation durch die Bindung von PABP1 in dieser Arbeit analysiert werden. Die Protein-Expression an der Plasmamembran könnte zu einer Veränderung des Migrations- oder Adhäsionsverhaltens der Zelle führen.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaktion* (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA mit Hilfe von zwei flankierenden, sequenzspezifischen Oligonukleotiden und thermostabilen DNA-Polymerasen. Dies geschieht in der Regel in drei Schritten:

1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C
2. Annealing der Primer bei der spezifischen Schmelztemperatur (48°C - 60°C)
3. Elongation an den Primern in 5'-3' Richtung durch die Taq-Polymerase bei 72°C

Durch Wiederholung dieser drei Schritte für 20x bis 35x Zyklen können definierte DNA-Bereiche exponentiell vermehrt werden. Die anschließende Auswertung erhaltener Amplifikate erfolgte durch Auftrennung im Agarose-Gel (siehe 2.1.2).

2.1.1.1 Standard-PCR

Um DNA-Konstrukte für die Klonierung in Vektoren zu erzeugen, wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung jeden Ansatzes und das Standard-PCR Programm sind Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 zu entnehmen. Das Programm wurde entsprechend der Annealing-Temperatur der Primer und der Größe des Fragments gewählt, wobei die Phusion® Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt, DE) 1 kb in 15-30 s generiert.

10 ng / 1 µl	Matrize DNA / cDNA
1,5 µl	Primer vorwärts [10 µM]
1,5 µl	Primer rückwärts [10 µM]
1 µl	dNTPs [10 mM]
10 µl	5x Phusion-Puffer
0,5 µl	Phusion Polymerase [2 U/µl]
ad 50 µl	dH ₂ O

Tabelle 1: Standard-PCR Ansatz

1x	98 °C	30 s
	98 °C	10 s
28x	48 - 65 °C	30 s
	72 °C	30 s - 2 min
1x	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Tabelle 2: Standard-PCR Programm

2.1.1.2 Kolonie-PCR

Um die von Bakterien aufgenommene Plasmid-DNA zu analysieren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurden einzelne angewachsene Bakterienkolonien in 10 µl Wasser resuspendiert und 1 µl der Bakteriensuspension für den PCR-Ansatz eingesetzt. Das Programm wurde entsprechend der Schmelztemperatur der Primer und der Größe des resultierenden Amplifikats gewählt, wobei die eingesetzte Taq-Polymerase 1 kb in 30-60 s generiert. Die Zusammensetzung des Ansatzes und das Programm sind Tabelle 3 bzw. Tabelle 4 zu entnehmen.

1 µl	Bakteriensuspension
0,2 µl	Primer vorwärts [10 µM]
0,2 µl	Primer rückwärts [10 µM]
0,125 µl	dNTPs [10 mM]
1,25 µl	10x Polymerase-Puffer
0,08 µl	Taq-Polymerase [5 U/µl]
ad 12,5 µl	dH ₂ O

Tabelle 3: Kolonie-PCR Ansatz

1x	98 °C	1 min
	94 °C	30 s
28x	48 - 65 °C	40 s
	72 °C	30 s - 2 min
1x	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Tabelle 4: Kolonie-PCR Programm

2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in Abhängigkeit der erwarteten DNA-Fragmentgröße ein 0,8 - 2 % TBE-Agarosegel verwendet und bei 90 V bis 120 V in 1 x TBE-Puffer (89 mM TRIS-Base, pH 8,3, 2,5 mM EDTA-Na₂, 89 mM Borsäure) aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel für 2 min im Ethidiumbromidbad (0,1 mg/ml in dH₂O) gefärbt. Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Gel wurde die DNA mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, DE) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

2.1.3 Klonierung

Zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T easy Vektor System (Promega, Mannheim, DE) verwendet. Der Klonierungsvektor pGEM zeichnet sich durch überhängende Thymine am 3'-Ende in der Restriktionsschnittstelle aus, in die mittels einer normalen Taq-Polymerase generierte DNA-Fragmente ligiert werden können. Um zusätzliche 3'-Adenosin-Überhänge an die neu-synthetisierte DNA anzufügen, wurde die PCR-Reaktion mit einer Taq-Polymerase, die keine 3'-5' Exonukleaseaktivität aufweist, für 20 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde das gelektrophoretisch aufgetrennte und aufgereinigte PCR-Fragment in den pGEM-Vektor ligiert. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl pGEM-Vektor (50 ng), 3 µl des PCR-Fragmentes, 5 µl 2 x Puffer (Rapid Ligationspuffer)

und 1 µl Ligase (3 U/µl). Die Ligationsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h und 3 µl des Ligationsansatzes wurden in kompetente *E. coli* transformiert (siehe 2.1.4).

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Zielvektor wurden sowohl der pGEM-Vektor, der die klonierten DNA-Fragmente enthielt, als auch der Zielvektor mit den gleichen Restriktions-Endonukleasen nach Angaben der Herstellerfirma (New England Biolabs, Frankfurt, DE) verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, DE) aufgereinigt (siehe 2.1.2). Die Ligation des endonukleolytisch geschnittenen Vektors und des DNA-Fragments wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterienstämme

Zur Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA wurde ein Aliquot der chemisch kompetenten Bakterien XL1-Blue oder DH5α auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 3 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.1.3) wurden die Bakterien 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C im Heizblock. Anschließend wurden die Bakterien sofort auf Eis gestellt und weitere 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium (0,5 % einer 1 M MgCl₂-Lösung, 30 % Glukose-Lösung, ad 10 ml SOB-Medium [2 % Pepton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl]) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C in Abwesenheit eines Selektionsantibiotikums geschüttelt, auf eine LB-Agarplatte (1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium) mit Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin, 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Kultivierung von Bakterien in einer Flüssigkultur wurde dem LB-Medium das entsprechende Selektionsantibiotikum zugesetzt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt.

2.1.5 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Plasmidpräparation wurden 3 ml LB-Medium, welches mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war, mittels einer Pipettenspitze mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatten angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Die Präparation erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, DE) nach Angaben des Herstellers.

Um Endotoxin-freie Plasmidepräparationen für die Transfektion von eukaryotischen Zellen zu erhalten, wurden Plasmide mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden, DE) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die Sequenzierungen von Plasmiden wurden mit entsprechenden Sequenzierungs-Primern (siehe 5.2.1) von der Firma StarSEQ GmbH (Mainz, DE) durchgeführt und erhaltene Sequenzen mit dem Programm FinchTV analysiert.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur von adhärenenten Zellen

Die adhärenenten Zelllinien HEK 293T, HeLa und K4IM-Synovialfibroblasten wurden in DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium), supplementiert mit 10 % inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin und 50 mg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂, gehalten. Die stabil transfizierten T/C28a4 Chondrozyten, die mit dem kompletten ADAM15, ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne sowie dem chimären Konstrukt I12Rα/ADAM15 transfiziert waren [36, 144], wurden in DMEM mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Puromycin kultiviert und für Versuche bis maximal Passage 20 verwendet. Die T/C28a4 Zelllinie ist eine Chondrozyten-Zelllinie, die aus humanem juvenilen Rippenknorpel gewonnen und mit dem SV40 *large-T*-Antigen immortalisiert wurde [145].

Für die weitere Passagierung wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und mittels einer Trypsin-Lösung (0,25 % in PBS) von der Zellkulturflasche abgelöst. Durch die Zugabe von FCS-enthaltendem Zellkulturmedium wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt, da das darin befindliche FCS Protease-Inhibitoren enthält, die inaktivierend auf Trypsin wirken. Für die längerfristige Lagerung wurden die Zellen im Einfriermedium (DMEM, supplementiert mit 20 % FCS, 10 % DMSO) bei -80°C langsam eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Patientenmaterial und Kultivierung von primären Chondrozyten

In dieser Arbeit wurde mit humanem Knorpelgewebe, welches Osteoarthritis-Patienten im Zuge von Hüft- oder Kniegelenk-Ersatzoperationen entnommen wurde, gearbeitet. Ein entsprechendes Ethikvotum des Universitätsklinikums Frankfurt für die Verarbeitung des primären Materials liegt vor. Alle Patienten wurden aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis zur Weitergabe des Gewebes gegeben. Das Primärmaterial von OA-Patienten wurde freundlicherweise von Frau Dr. Adolf (Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Zur Isolierung von Chondrozyten wurde der Knorpel in kleine (2-5 mm) Stücke zerkleinert und diese unter Schütteln im CO₂-Inkubator bei 37 °C sequentiell proteolytisch verdaut: Zunächst mit Pronase (1 mg/ml in PBS) bei 37 °C für 30 min und danach mit bakterieller

Kollagenase (1,5 mg/ml in PBS) für weitere 16-24 h bei 37 °C. Um nicht verdaute Knorpelreste zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und in DMEM/HAM's F12 Medium (supplementiert mit 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin) resuspendiert. Die primären Chondrozyten konnten für 4-6 Passagen kultiviert werden.

2.2.3 Zellstimulation

2.2.3.1 Stimulation mit Camptothecin

1×10^5 stabil mit ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne transfizierte T/C28a4 Chondrozyten oder primäre OA-Chondrozyten wurden in eine 24-*well* Kulturplatte für 24 h ausgesät und danach für 0-60 min mit 2 oder 20 µM Camptothecin in FCS-freiem Medium bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, sofort auf Eis im *well* mit 50 µl Lysepuffer lysiert (siehe 2.3.1) und mittels BCA-Test der Proteingehalt der Proben ermittelt, um die Proteinlysate mittels Western Blot (siehe 2.3.3) zu analysieren.

2.2.3.2 Stimulation mit Interleukin 2

Um Signalwege, die durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 aktiviert werden, auch in den Zellen, die mit dem chimären Konstrukt aus der α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (IL2R α /ADAM15) transfiziert waren, auszulösen, wurden 1×10^5 Zellen im 24-*well* für 24 h ausgesät und danach für 0-5 min mit 100 IU/ml Interleukin-2 in FCS-freiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und sofort auf Eis im *well* mit 50 µl Lysepuffer lysiert (siehe 2.3.1). Der Proteingehalt der Proben wurde mittels BCA-Test ermittelt und die Proteinlysate mittels Western Blot (siehe 2.3.3) oder Immunpräzipitation analysiert.

2.2.4 RNA-Interferenz

Als RNA-Interferenz (RNAi) oder RNA-*Silencing* bezeichnet man das gezielte Abschalten von Genen durch das Einschleusen von kurzen synthetischen RNA-Sequenzen (siRNA: *small interfering RNA*). Um die ADAM15 Expression herab zu regulieren, wurden 5×10^4 Zellen in 96-*well* Zellkulturplatten oder 5×10^5 Zellen in 24-*well* Zellkulturplatten eingesät und mit 5 pmol spezifischen siRNAs gegen ADAM15 oder einer unspezifischen, negativen siRNA (Life Technologies) mit Saint-Red der Firma Synvolux nach Herstellerangaben für 48 h inkubiert.

2.2.5 Mammalian Two-Hybrid (M2H)

Um die Interaktion von zwei Proteinen *in vivo* zu untersuchen, wurde die *Mammalian Two-Hybrid* Technik genutzt. Das Prinzip beruht darauf, dass ein Transkriptionsfaktor, der aus einer DNA-bindenden Domäne und einer Aktivierungsdomäne besteht, auch nach Aufteilung beider Untereinheiten auf zwei Plasmide wieder einen funktionsfähigen Transkriptionsfaktor bildet, wenn beide Untereinheiten in räumliche Nähe kommen. Dafür werden die zu untersuchenden Interaktionspartner X und Y als Fusionsproteine jeweils in einem *bait*-, der die DNA-Bindedomäne (z.B. GAL4) enthält, bzw. einem *prey*-Vektor, der die Aktivierungsdomäne (z.B. NFκB) enthält, exprimiert. Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine X und Y kommen die beiden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe und es bildet sich ein funktioneller Transkriptionsfaktor, der dann durch die Bindung an die GAL4-Bindedomänen eines *Firefly* Luziferase Reporterplasmids die Translation der Luziferase initiiert (Abbildung 10).

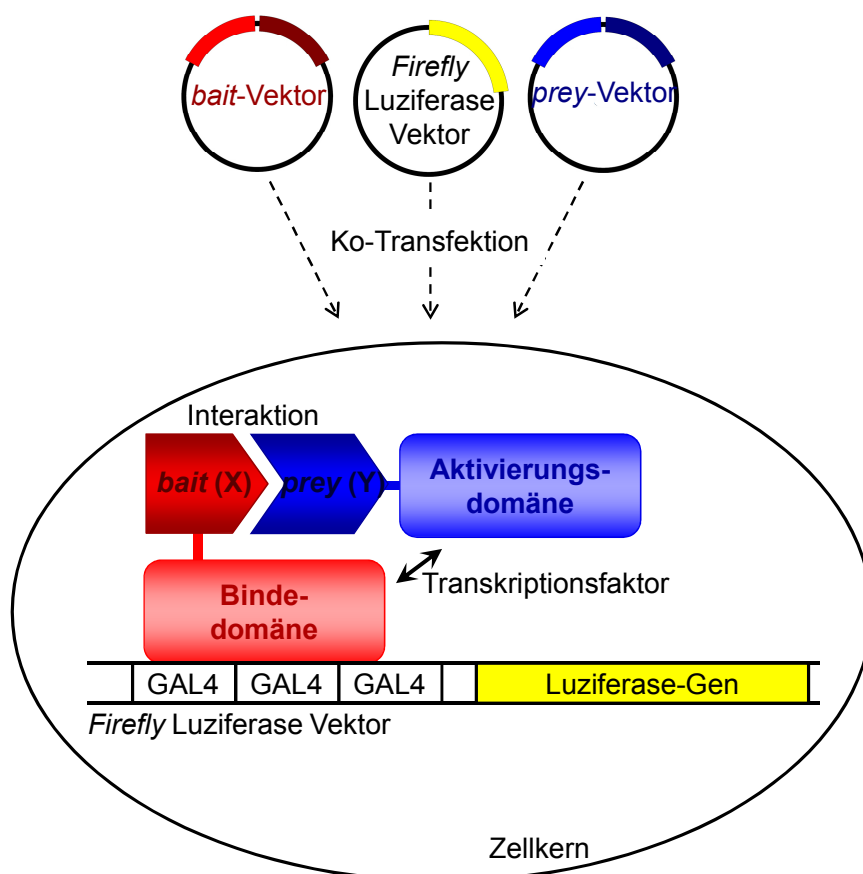


Abbildung 10: Mammalian Two-Hybrid (M2H) -Prinzip. Mit der M2H-Methode kann die Interaktion von zwei Proteinen *in vivo* detektiert werden. Nach der Ko-Transfektion von *bait*-, *prey*- und *Firefly* Luziferase Vektor werden die Fusionsproteine aus dem *bait*-Protein und der DNA-Bindedomäne bzw. dem *prey*-Protein und der Aktivierungsdomäne exprimiert. Bei der Interaktion von *bait*- und *prey*-Protein wird aus der räumlichen Nähe von Binde- zu Aktivierungsdomäne ein funktioneller

Transkriptionsfaktor gebildet und die *Firefly* Luziferase translatiert. (Abbildung modifiziert nach dem "Mammalian Two-Hybrid Assay Kit - Instruction Manual" von Stratagene.)

Für die Analyse der Interaktion von ADAM15 mit FAK als auch PABP wurde das Mammalian Two-Hybrid Assay Kit von Stratagene verwendet. Dazu wurden die FAK- und PABP-Fragmente zwischen die *Bam*HI und *Not*I Restriktionsschnittstellen des Vektors pCMV-BD (*bait*) und die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 zwischen die *Bam*HI und *Not*I Restriktionsschnittstellen des Vektors pCMV-AD (*prey*) kloniert. Die Primer, die zur Generierung der jeweiligen Fragmente mittels PCR verwendet wurden, sind Punkt 5.2.1 zu entnehmen. 1×10^4 HEK 293T-Zellen wurden in Quadruplikaten in eine 96-*well* Zellkulturplatte für 24 h ausgesät und mittels des JetPEI Transfektionsreagenz (0,5 µl; Polyplus transfection, Darmstadt, DE) mit je 10 ng des *bait*- und *prey*-Vektors, 250 ng des *Firefly* Luziferase Vektors und 10 ng eines *Renilla* Luziferase Plasmids (pRL-TK, Promega) zur Kontrolle der Transfektionseffizienz transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System von Promega nach Angaben des Herstellers im Plattenlesegerät gemessen. Jeder Versuch wurde mindestens 5 mal wiederholt und die gemessenen Werte der *Firefly* Luziferase wurden gegen die Werte der *Renilla* Luziferase normalisiert.

2.2.6 Re-Adhäsionsassay

Für den Re-Adhäsionsassay wurden Zellen mittels chemischer oder mechanischer Behandlung sanft von der Oberfläche der Zellkulturschalen abgelöst und auf Objektträger (8-*well* Zellkulturkammer aus PCA (*chamberslide*), Sarstedt, Nümbrecht) für die anschließende immunzytologische Anfärbung oder auf 10 cm Zellkulturschalen für die nachfolgenden proteinbiochemischen Versuche re-adhärert. Dafür wurden auf Objektträger aufgewachsene K4IM-Synovialfibroblasten oder HeLa-Zellen (1×10^5) zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 % EDTA (w/v) inkubiert bis sie kurz davor waren sich abzulösen. Die EDTA-Lösung wurde vorsichtig abgenommen, die noch wenig haftenden Zellen mit Medium mit 10 % FCS abgespült und resuspendiert und für 60 - 120 min re-adhärert. Da EDTA für das Ablösen von OA-Chondrozyten nicht ausreicht, wurden diese vorsichtig mit einem Zellschaber von einer 6-*well* Kulturschale abgekratzt, in FCS-haltigem Medium aufgenommen und für die Adhäsion in ein *chamberslide* eingesät.

Für die proteinbiochemischen Versuche wurden HeLa-Zellen, K4IM-Synovialfibroblasten oder die mit Kontrollvektor, ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne transfizierten T/C28a4 Chondrozyten in 10 cm Kulturschalen ausgesät und bis zu 90 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden mit 0,5 % EDTA (w/v) vollständig abgelöst und in

DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen zurück gesät und für 30-120 min adhärirt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellen von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die adhärenenten Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in PBS zusammengekratzt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt, für 5 min bei 1900 x g zentrifugiert und erneut mit 5 ml PBS gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden in Abhängigkeit des nachfolgenden Versuchs in einem spezifischen Lysepuffer lysiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nachdem die Zelltrümmer bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Test (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Alle Schritte wurden mit gekühlten Puffern und Zentrifugen bei 4 °C durchgeführt.

2.3.2 SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 30-130 kDa wurden 10 % und für kleinere Molekulargewichte 14 % SDS-Gele verwendet. Dafür wurde ein 10 % bzw. 14 % Trenngel und ein 4 % Sammelgel gegossen. Die Zusammensetzungen der SDS-Gele sind unter Punkt 5.2.8 beschrieben. Zelllysate wurden wie unter 2.3.1 beschrieben in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100 v/v, 0,25 % Natriumdesoxycholat v/v, 0,1 % NaF v/v, 0,1 % Phosphataseinhibitor-Cocktail II v/v, 0,1 % Phosphataseinhibitor-Cocktail III v/v, 1 Tablette/10 ml Proteaseinhibitor EDTA-free) resuspendiert, im 6 x SDS-Ladepuffer mit oder ohne β -Mercaptoethanol (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS w/v, 50 % Glycerin v/v, 0,4 % Bromphenolblau w/v, 5 % β -Mercaptoethanol v/v) für 5 min bei 95 °C denaturiert und 20-60 μ g Protein in eine Geltasche geladen. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte im Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin und 5 % SDS (w/v)) bei einer Spannung von 120 V für ca. 90 min.

Die Polyacrylamidgele wurden mittels Coomassie-Färbung (PlusOne Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350, GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers gefärbt oder für Western Blots weiter verwendet.

2.3.3 Western-Blot

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran mittels eines *Semi-Dry Blot* Systems unter Verwendung des Blottingpuffers (25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 20 % Methanol v/v) bei 40 mA pro Blot für 1 h bei RT transferiert. Nach Blockierung mit PBST + 5 % Milchpulver w/v (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween-20 v/v, pH 7,4) wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern inkubiert (siehe 5.2.4), dreimal für 5 min in PBST gewaschen und anschließend für 60 min bei RT mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (siehe 5.2.4) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST wurde die Membran für 1 min mit ECL-Reagenz (PerkinElmer) entwickelt und mit einem photosensitiven Film detektiert.

2.3.4 Plasmamembranpräparation im Sucrose-Dichtegradienten

Die Isolation der Plasmamembran erfolgte über einen Sucrosegredienten, bei dem sich die Zellorganelle nach ihrer Dichte auftrennen. Mit ADAM15 transfizierte T/C28a4 Chondrozyten wurden in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert und nach Waschen in PBS mit einem Zellschaber in PBS zusammengekratzt und bei 1900 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,6 ml HBS (50 mM HEPES, pH 7,0, 140 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 1x Protease-Inhibitor) resuspendiert. Die Suspension wurde viermal mit Ultraschall (20 s, 7 cycles, 50 %) behandelt und bei 450 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (0,4 ml) wurde auf einen Sucrose-Gradienten aufgebracht, bestehend aus verschiedenen Sucroselösungen, die wie folgt übereinander geschichtet wurden: 1,6 ml 60 %, 1,6 ml 38 %, 1,28 ml 15 % Sucrose (w/v), jeweils in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4. Der Gradient wurde für 1 h bei 112000 x g im Ausschwingrotor ohne Bremse ultrazentrifugiert. Aus der Schicht zwischen 60 % und 38 % Sucrose wurden 400 µl Probe mit einer langen Kanüle abgesaugt, 4 Proben vereinigt und auf 12 ml mit 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgefüllt. Die verdünnte Membranfraktion wurde für 2,5 h bei 186000 x g ultrazentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Membranpellet mit 160 µl PBS/1 % Triton X-100 (v/v) mit Protease-Inhibitor über Nacht bei 4 °C solubilisiert. Nach Sonifikation im Ultraschallbad für 5 min wurde das Lysat bei 10000 x g für 15 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich die Triton-lösliche Fraktion der Plasmamembran, welche mittels Immunblot analysiert wurde.

2.3.5 Biotinylierung und Kreuzvernetzung von Oberflächenproteinen

K4IM-Synovialfibroblasten, HeLa-Zellen oder die mit Vektorkontrolle, ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne stabil transfizierten T/C28a4 Chondrozyten wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 3-4 Tage bis zur Subkonfluenz kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die adhärenen Zellen mit 1,3 ml des

membranimpermeablen EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (0,1 mg/ml in PBS, pH 8,0, supplemetiert mit 0,9 mM CaCl_2 und 0,5 mM MgCl_2) für 15 min bei RT biotinyliert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 5 ml Formaldehyd-Lösung (1 % Paraformaldehyd gelöst in PBS) für 5 min bei RT schwenkend kreuzvernetzt und die Reaktion durch die Zugabe von 500 μl 2,5 M Glycin für 5 min gequencht. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber zusammengekratzt, bei 3000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet aus 3 Schalen wurde in 200 μl Immunpräzipitation-Lysepuffer lysiert und mit Ultraschall behandelt (30 s, 7 Zyklen, 50 % Leistung). Große Zelltrümmer und unzerstörte Zellen wurden für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand für die Präzipitation an Streptavidin konjugierten Magnetkügelchen eingesetzt. Dazu wurden 500 μg Zelllysate in 250 μl Lysepuffer zusammen mit 10 μl Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen (Thermo Fisher Scientific) und mit 0,1 μl Benzonase Nuclease, um ein Verkleben der Magnetkügelchen durch die im Ultraschall freigesetzte DNA zu verhindern, unter Rotation bei RT für 2 h inkubiert. Die Magnetkügelchen wurden mit Hilfe eines Magneten separiert, dreimal in PBS/0,1 % Triton X-100 gewaschen und in SDS-Ladepuffer mit β -ME (siehe 2.3.2) für 15 min bei 99 °C aufgeköcht, um die durch Kreuzvernetzung entstandenen Proteinkomplexe zu revertieren. Anschließend wurden die Proben einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen (siehe 2.3.2 und 2.3.3).

2.3.6 Nachweis von mRNA Translation mittels Puromycin

Um die Translation an der Plasmamembran mittels Immunblot zu untersuchen, wurde das *Surface sensing of translation* (SUnSET) verwendet. SUnSET ist eine nicht radioaktive Methode, bei der mit Hilfe des Einbaus von Puromycin die während der Translation entstehenden Proteine in einer Zelle quantifiziert werden können [146]. In diesen Versuchen wurden während der Biotinylierung von Membranproteinen, wie unter 2.3.5 beschrieben, zusätzlich 10 mg/ml Puromycin zugegeben. Die Lysate der mit Puromycin behandelten, biotinylierten und kreuzvernetzten Zellen wurden nach der Biotin-Präzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot mit anti-Puromycin Antikörpern (1:5000) analysiert.

Für den Nachweis der Translation an der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten auf Objektträgern ausgesät und einem Re-Adhäsionsassay unterzogen (siehe 2.2.6). Nach der entsprechenden Adhäsionszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid in FCS-freiem Medium für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid gewaschen und für 1 min in PBS/0,05 % Saponin mit 100 mg/ml Cycloheximid auf Eis permeabilisiert, um das ungebundene Puromycin aus den Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal

rasch mit eiskaltem PBS mit 100 µg/ml Cycloheximid gewaschen und sofort mit 4 % Formaldehyd-Lösung für 10 min fixiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der Immunfluoreszenzfärbung unter 2.4.1, wobei die anti-Puromycin Antikörper 1:10000 verdünnt eingesetzt wurde.

2.3.7 Proteinbindungsstudien

2.3.7.1 Ko-Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Proteininteraktionen wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden adhärente Zellen zusammengekratzt, wie unter 2.3.1 detailliert beschrieben, und in 20-100 µl Lysepuffer (10 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100 v/v, 0,1 % Phosphataseinhibitor-Cocktail II v/v, 0,1 % Phosphataseinhibitor-Cocktail III v/v, 1 Tablette/10 ml Proteaseinhibitor EDTA-free) lysiert. 250-1000 µg Zelllysate wurde mit 0,5-1 µg der entsprechenden Antikörper sowie 20 µl Protein A/G Agarose versetzt und für 90 min bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Es folgten 4 Waschschrte, wobei der Ansatz jeweils in eiskaltem PBS/0,1 % Triton X-100 resuspendiert und bei 13000 rpm bei 4 °C für 2 min abzentrifugiert wurde. Das Agarose-Pellet wurde in 10 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen und einer SDS-PAGE unterworfen (siehe 2.3.2).

2.3.7.2 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Für die Expression von FAK-Domänen, PABP-Domänen und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 wurden amplifizierte DNA-Fragmente in die *Bam*HI- und *Not*I-Schnittstelle des pGEX-6P-3 Vektors, der am 5'-Ende einen GST-*tag* kodiert, kloniert und als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. Für die bakterielle Proteinexpression der verschiedenen FAK-Domänen und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 wurden der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS mit 100 ng Plasmid aufgrund der geringen Transformationseffizienz transformiert. Für die Expression der GST-PABP-Fusionsproteine wurden Rosetta(DE3)pLysS mit 10 ng der entsprechenden Plasmide nach Herstellerangaben (Merck, Darmstadt, DE) transformiert (siehe 2.1.4).

Dazu wurden transformierte Bakterien von einer LB-Platte (siehe 2.1.4) in 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und über Nacht geschüttelt. Ein Aliquot wurde in 100-500 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Dann wurde mit 1 mM IPTG die Expression der Fusionsproteine in den Bakterien induziert und die Bakteriensuspension für 3-4 h schüttelnd bei Raumtemperatur und 200 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei

4000 x g und 4 °C 20 min geerntet und die Proteine mittels Affinitätsaufreinigung an GSH-Sepharose aus dem Bakterienpellet extrahiert.

Dafür wurde 1 g Bakterienpellet mit 5 ml BugBuster Protein Extraction Reagent (Merck), dem 1 kU/ml Lysozym zugesetzt wurde, für 20 min bei RT lysiert. Zum Verdau der freigesetzten genomischen DNA wurde während der Lyse 1 U/ml Benzonase Nuclease zugegeben und zusätzlich mit 1 Tablette/10 ml Proteaseinhibitor EDTA-free zum Schutz vor Proteindegradation versetzt. Das Lysat wurde für 20 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand nach Zugabe von 100 µl 50 % (v/v) GSH-Sepharose pro ml für 90 min bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Sepharose wurde bei 1600 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert, dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die gebundenen Fusionsproteine mit 100 µl 50 mM Glutathion in Tris-HCl (pH 8,0) pro 100 µl Sepharose für 10 min bei RT eluiert. Die Sepharose wurde noch zweimal mit 100 µl Glutathion eluiert und alle Eluate vereinigt.

Um den GST-tag an den Proteinen zu entfernen, wurde die GSH-Sepharose mit den daran gebundenen Proteinen dreimal mit PBS gewaschen und durch zweimaliges Waschen mit PreScission-Protease-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 14 mM β -Mercaptoethanol) äquilibriert. Die Sepharose wurde zu einer 50 % (v/v) Suspension mit PreScission-Protease-Puffer verdünnt, mit 3 µl PreScission Protease pro 100 µl Suspension versetzt und über Nacht bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit dem gebundenen GST abzentrifugiert und der Überstand, der das abgeschnittene Protein enthält, abgenommen.

Die Reinheit und Konzentration der Proteine wurden über ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel (siehe 2.3.2) mit einer BSA-Standardreihe, bei der mindestens 3 verschiedene Mengen BSA auf das Gel aufgetragen waren, bestimmt.

2.3.7.3 *Pulldown-Assay* mit zwei rekombinanten Proteinen

Für die Untersuchung der Proteinbindung von ADAM15 und FAK wurden verschiedene GST-FAK-Domänen und die zytoplasmatische Domäne von ADAM15, die zusätzlich noch einen Myc-tag enthält, als GST-Fusionsprotein hergestellt. Bei der zytoplasmatische Domäne von ADAM15 wurde der GST-tag mittels PreScission Protease entfernt (siehe 2.3.7.2).

50 bzw. 100 ng der jeweiligen FAK-GST-Fusionsproteine wurden zusammen mit 50 bzw. 100 ng der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 in 0,5 mg/ml Zelllysate aus T/C28a4 Chondrozyten in einem Volumen von 300 µl aufgenommen, mit 20 µl GSH-Sepharose versetzt und für 90 min bei 4 °C unter ständiger Rotation inkubiert. Die Sepharose wurde dreimal mit 200 µl eiskaltem PBS/0,1 % Triton X-100 gewaschen. Nach dem letzten

Waschschritt wurde der Überstand restlos abgenommen, die Sepharose mit SDS-Ladepuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.3.7.4 *Dot Blot*

25-150 ng FAK-GST-Fusionsproteine wurden in einem Volumen von 5 µl vorsichtig auf eine trockene Nitrozellulose-Membran aufgebracht und die Membran nach dem Trocknen in PBS/0,5 % Tween (PBST)/5 % Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 2 µg/ml der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von ADAM15, bei der der GST-tag proteolytisch entfernt war, in PBST/1 % Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran mit anti-Myc Antikörpern (Verdünnung 1:5000) in PBST/1 % Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, mit PBST gewaschen und mit ECL-Reagenz entwickelt (siehe 2.3.3).

2.3.7.5 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Für die Proteinbindungsstudien im ELISA-Format wurde eine 96-well Mikrotiterplatte mit 100 ng/100 µl in PBS pro well der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von ADAM15, bei der der GST-tag proteolytisch entfernt war, in Quadruplikaten beschichtet. Die wells wurden dreimal mit je 250 µl PBST gewaschen und 1 h mit 1 % (w/v) BSA in PBS blockiert. Die wells wurden dreimal mit PBST gewaschen und mit 500 nM GST-PABP-Fusionsprotein in PBS für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit HRP-gekoppelten anti-GST Antikörpern (Verdünnung 1:500) für 1 h inkubiert, danach abermals gewaschen, mit 100 µl ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) entwickelt und bei 405 nm gemessen.

2.4 Fluoreszenz-Färbung von Zellen

2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne transfizierte T/C28a4 Chondrozyten, OA-Chondrozyten, HeLa-Zellen oder K4IM-Synovialfibroblasten auf unbeschichteten oder mit Kollagen Typ II (CII) (50 µg/ml) beschichteten 8-kammerigen Objektträgern ausgesät, wobei pro Kammer $1-5 \times 10^4$ Zellen ausgesät wurden. Nach 10 min Fixierung mit 4 % Formaldehyd-Lösung (4 % Paraformaldehyd gelöst in PBS) wurden die Zellen mit PBS/0,5 % Triton X-100 für 10 min und PBS/0,1 % Triton X-100 für dreimal 3 min permeabilisiert. Nach Waschen mit PBS wurden die freien Bindungsstellen auf dem Objektträger mit PBS/0,1 % Triton X-100/1 %

BSA (w/v) für 30 min blockiert, anschließend einmal mit PBS gewaschen und für 2 h mit Primärantikörpern, der je nach eingesetzten Antikörpern 1:50-1:10 000 in PBS/0,1 % BSA (w/v) verdünnt wurden (siehe Tabelle 5) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1 % BSA (w/v) für je 5 min wurden die Zellen mit Alexa Fluor konjugierten Sekundärantikörpern (1:100-1:500 in PBS/0,1 % BSA verdünnt, siehe Tabelle 5) für 1 h bei Dunkelheit inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (5 µg/ml in H₂O) für 2 min gefärbt und mehrfach mit H₂O gewaschen. Die Objektträger wurden mit einem Fluoreszenz-schützenden Medium eingedeckt und mit dem Konfokalmikroskop (*Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM)) LSM 510 Meta von Zeiss (Jena, D) mit einem 40x Objektiv (EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27, Zeiss, Jena, D) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software ZEN2008 (Zeiss, Jena, D) als auch dem ImageJ Programm.

Für die Inhibition des Transports von Proteinen aus dem Zellkern wurden HeLa-Zellen mit dem Kernexportinhibitor Leptomycin B behandelt und mit Antikörpern gegen PABP angefärbt [147]. Dafür wurden 1×10^4 HeLa-Zellen für 24 h auf Objektträgern ausgesät und für weitere 24 h mit 10 ng/ml Leptomycin B in FCS-freiem Medium inkubiert.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung

Primärantikörper	Wirt	Verd. 1° AK	Sekundärantikörper	Wirt	Verd. 2° AK
anti-ADAM15 (Ectodomain)	Ziege	1:50	Anti-Ziege Alexa Fluor 488	Esel	1:500
anti-FAK, clone 4.47	Maus	1:100	Anti-Maus Alexa Fluor 594	Kaninchen	1:100
anti-PABP	Kaninchen	1:500	Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	Ziege	1:500
anti-Puromycin, clone 12D10	Maus	1:10000	Anti-Maus Alexa Fluor 488 Anti-Maus Alexa Fluor 594	Ziege Kaninchen	1:500 1:500

2.4.2 Durchflusszytometrie

Die stabil mit Kontrollvektor, ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne transfizierten T/C28a4 Chondrozyten wurden mit gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 gerichteten Antikörpern gefärbt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1 trypsinisiert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf 1×10^6 Zellen/ml in PBS resuspendiert, $0,5 \times 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit 1 ml PBS aufgefüllt. Die Röhrchen wurden für 5 min bei 1600 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Der Rücklauf im Röhrchen ergab ungefähr 100 µl, worin die Ziege anti-ADAM15 Antikörper (1:200 verdünnt, R&D Systems) mit den Zellen gut durchmischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert wurden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit Esel anti-Ziege Alexa Fluor 488 konjugierten Sekundärantikörpern (1:200) versetzt und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurden die Zellen in 300 µl

PBS gut resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS Canto II, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 ADAM15-Expression im Zellkulturmodell

Für die Untersuchung der funktionellen Aspekte von ADAM15 war ein Zellkulturmodell aus der Chondrozyten-Zelllinie T/C28a4 entwickelt worden, das mit verschiedenen ADAM15-Konstrukten stabil transfiziert worden war [36, 144]. Die transfizierten Zellen exprimierten ADAM15, eine ADAM15-Mutante, bei der die zytoplasmatische Domäne deletiert wurde (ADAM15 Δ Zyto), oder ein chimäres Konstrukt, das aus der α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R α oder CD25) und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (IL2R α /ZytoADAM15) besteht (Abbildung 11).

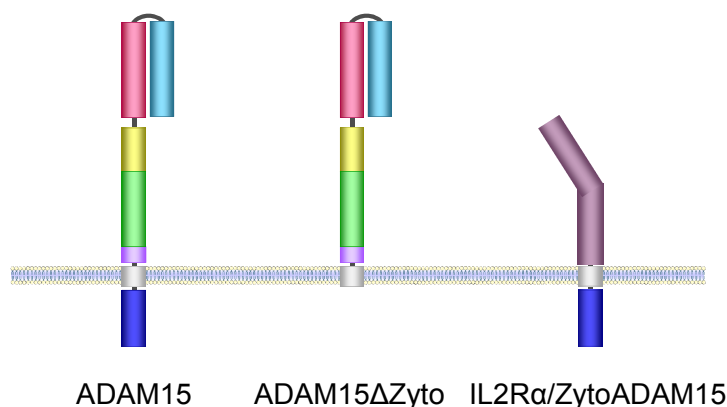


Abbildung 11: Schematische Darstellung der ADAM15-Konstrukte zur Generierung der stabil transfizierten Chondrozyten-Zelllinie T/C28a4: komplettes ADAM15, ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne (ADAM15 Δ Zyto) und das chimäre Konstrukt bestehend aus der α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R α oder CD25) und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (IL2R α /ZytoADAM15).

Zur Kontrolle der Expression von ADAM15 wurden Lysate der verschiedenen Zelllinien mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot analysiert. Unter Verwendung von gegen die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 gerichteten Antikörpern zeigte sich bei Zellen, die mit dem kompletten ADAM15 transfiziert waren, ein Signal bei ungefähr 90 kDa, wohingegen bei mit ADAM15 Δ Zyto transfizierten Zellen kein Signal nachgewiesen werden konnte, da bei diesem Konstrukt die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 fehlt (Abbildung 12A). Wurden Antikörper gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 eingesetzt, so konnte ebenfalls ein Signal in Zellen, die mit dem kompletten ADAM15

transfiziert waren, bei 90 kDa und bei den ADAM15 Δ Zyto-transfizierten Zellen bei ungefähr 80 kDa detektiert werden (Abbildung 12B).

Die Expression des chimären IL2R α /ZytoADAM15 Konstrukts in der Chondrozyten Zelllinie ergab mit ADAM15-Antikörpern, der gegen die zytoplasmatische Domäne gerichtet ist, als auch mit Antikörpern gegen IL2R α (CD25) ein Signal bei ungefähr 60 kDa (Abbildung 12C). Zellen die nur mit Kontrollvektor transfiziert waren, wiesen mit allen eingesetzten Antikörpern gegen ADAM15 keine Expression von ADAM15 auf.

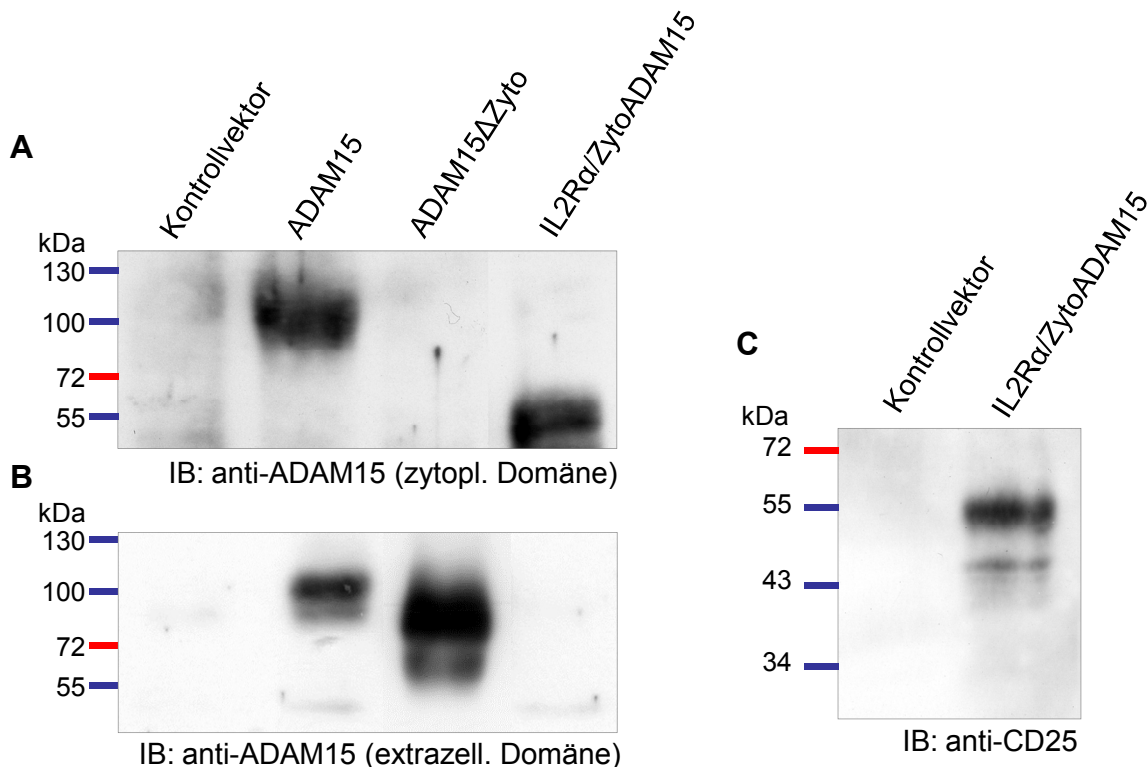


Abbildung 12: ADAM15-Expression der verschiedenen Konstrukte in T/C28a4 Zellen. (A-C) Lysate von T/C28a4-Zellen, die mit Kontrollvektor, ADAM15, ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne (ADAM15 Δ Zyto) oder dem chimären Konstrukt aus IL2R α und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (IL2R α /ZytoADAM15) transfiziert waren, wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunblot (IB) detektiert. **(A)** Detektion mit anti-ADAM15 Antikörpern, der gegen die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 gerichtet ist. **(B)** Detektion mit anti-ADAM15 Antikörpern, der gegen die extrazelluläre Domäne von ADAM15 gerichtet ist. **(C)** Detektion mit anti-CD25 (IL2R α) Antikörpern.

Des Weiteren wurde die Expression von ADAM15 in den mit Kontrollvektor, ADAM15 und ADAM15 Δ Zyto stabil transfizierten T/C28a4 Zellen mittels Oberflächen-Fluoreszenzmarkierung der Zellen und anschließender Durchflusszytometrie gezeigt. Die schonend trypsinisierten Zellen wurden dafür mit gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 gerichteten, aus der Ziege stammenden Antikörpern inkubiert, mit Alexa Fluor 488

gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt und Triplikate der einzelnen Versuchsbedingungen im Durchflusszytometer gemessen. In einem *Dot Plot* bei dem das Vorwärtsstreulicht (FSC [gibt das Zellvolumen wieder]) gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC [gibt die Zellgranularität wieder]) aufgetragen war, wurde die zu analysierende Zellpopulation ausgewählt, wobei Zelltrümmer und Zellaggregate ausgeschlossen wurden (Abbildung 13B, D, F). Die Fluoreszenzintensität der ausgewählten Zellpopulation wurde als Histogramm dargestellt und diese mit der Hintergrundfluoreszenz von Zellen, die nur mit Sekundärantikörpern inkubiert wurden, verglichen (Abbildung 13A, C, E). Die basale Expression von ADAM15 an der Zelloberfläche lag bei mit Kontrollvektor transfizierten Zellen im Vergleich zur Sekundärantikörper-Negativkontrolle bei $5,21 \pm 0,19$ %. Zellen, die mit dem kompletten ADAM15 transfizierten waren, zeigten im Vergleich zur Sekundärantikörper-Negativkontrolle eine ADAM15-Oberflächenexpression von $45,98 \pm 3,96$ %. Die mit der Deletionsmutante ADAM15 Δ Zyto transfizierten Zellen wiesen mit $59,29 \pm 2,12$ % Expression eine etwas höhere Expression des ADAM15-Konstruktes auf als die mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen.

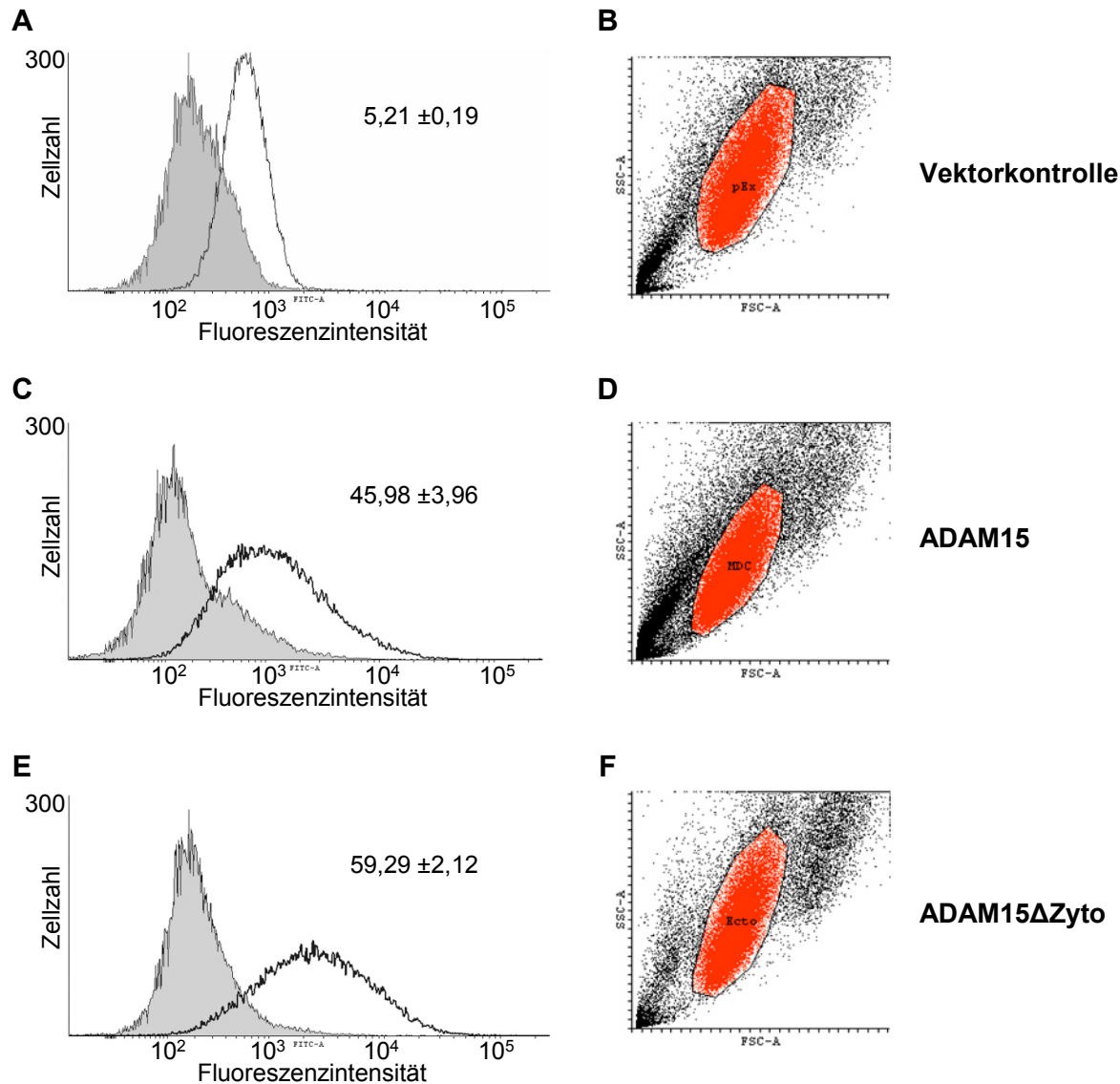


Abbildung 13: Untersuchung der ADAM15-Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie. (A-F) Zellen, die mit dem Kontrollvektor, ADAM15 oder ADAM15 Δ Zyto transfiziert waren, wurden mit gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 gerichteten Antikörpern (Ziege) inkubiert, mit Alexa Fluor 488 konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (A, C, E) Die Histogramme geben die Fluoreszenzintensität der positiv gefärbten Zellen als dicke, schwarze Linie im Vergleich zur Negativkontrolle (grau), die nur mit Sekundärantikörpern inkubiert wurde, wieder, wobei bei den positiven Zellen die Fluoreszenzintensität zunimmt. Zellen, die mit ADAM15 Δ Zyto transfiziert sind (E), zeigen eine etwas höhere Oberflächenexpression des ADAM15-Konstruktes ($59,29 \% \pm 2,21$) als mit ADAM15 transfizierte Zellen ($45,98 \% \pm 3,96$) (C), die mit Kontrollvektor transfizierten Zellen (A) haben mit $5,21 \% \pm 0,19$ eine sehr geringe ADAM15-Expression. (B, D, F) Die Dot Plots zeigen in der Darstellung Vorwärtstreulicht (FSC) versus Seitwärtstreulicht (SSC) die zur Erstellung der Histogramme ausgewählte Zellpopulation (rot) an. Gemessen wurden Triplikate und die Werte in $\% \pm$ Standardabweichung dargestellt.

Um die im Zellkulturmodell artifiziiell generierte ADAM15-Überexpression mit der Expression von ADAM15 in humanen osteoarthrotischen (OA) Chondrozyten in der pathophysiologischen Situation zu vergleichen, wurden Zelllysate von OA-Chondrozyten verschiedener Patienten im Immunblot mit Antikörpern gegen die Prodomäne von ADAM15 im Vergleich zu Zelllysaten aus T/C28a4-Zellen, die mit ADAM15 transfiziert waren, analysiert. Die Mehrheit der untersuchten OA-Chondrozyten (> 80 %) wies eine wesentlich höhere Menge an ADAM15 auf als die mit ADAM15-transfizierten T/C28a4-Zellen (Abbildung 14), was die im Vergleich zur Überexpression im Zellkulturmodell hohe Expression von ADAM15 *in vivo* in OA-Chondrozyten veranschaulicht.

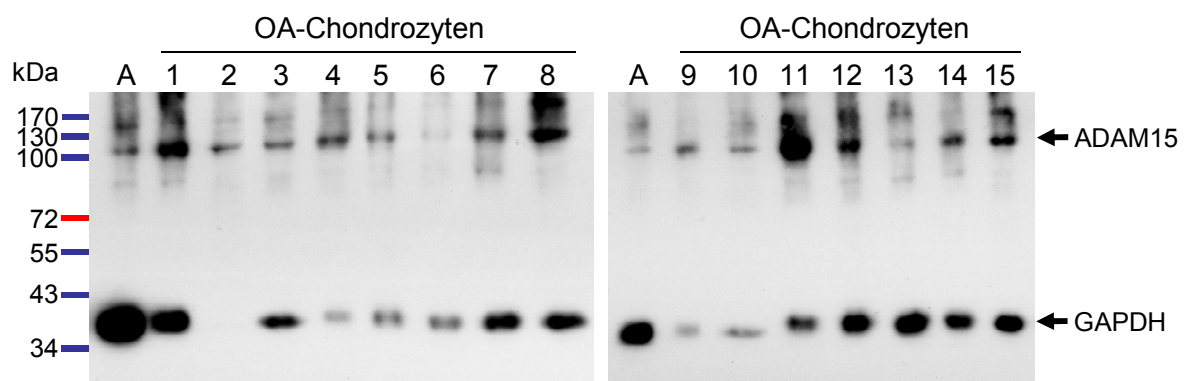


Abbildung 14: ADAM15-Expression in OA-Chondrozyten. Zelllysate von mit ADAM15 transfizierten T/C28a4-Zellen (A (40 µg)) und von humanen osteoarthrotischen (OA) Chondrozyten verschiedener Patienten (2, 4-6 (<10 µg), 1, 3, 7-10 (20 µg), 11-15 (40 µg)) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunblot mit gegen ADAM15 gerichteten Antikörpern detektiert. Die Beladungskontrolle erfolgte durch die simultane Inkubation mit anti-GAPDH Antikörpern.

3.2 Einfluss der Interaktion von ADAM15 und der Fokalen Adhäsionskinase auf die Signaltransduktion in OA-Chondrozyten

3.2.1 Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15 anhand von rekombinanten Proteinen

3.2.1.1 Expression von rekombinanten Domänen der Fokalen Adhäsionskinase

Durch Ko-Immunpräzipitationen konnte die Bindung von ADAM15 und der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) in Lysaten von der ADAM15-transfizierten T/C28a4 Chondrozyten-Zelllinie als auch von primären OA-Chondrozyten in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden

[36]. Besonders die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 hatte einen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand der FAK. Deshalb sollte im Weiteren sollte bestimmt werden, welche Domäne der FAK an die zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 bindet. Dafür wurden zunächst rekombinante Proteine hergestellt, die einerseits aus verschiedenen Domänen von FAK und andererseits aus der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 bestanden und in verschiedenen Protein-Bindungsversuchen, wie *Dot Blot* und *Pulldown Assay*, untersucht wurden. Die verschiedenen Domänen der FAK (siehe 1.3 Abbildung 5), nämlich die FERM-Domäne (Aminosäure 33-355), die Kinase-Domäne (422-676) als auch die Linker-Region (707-913) wurden jeweils als GST-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* exprimiert. Die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15) wurde zusätzlich zum GST-*tag* mit einem Myc-*tag* versehen (Abbildung 15).

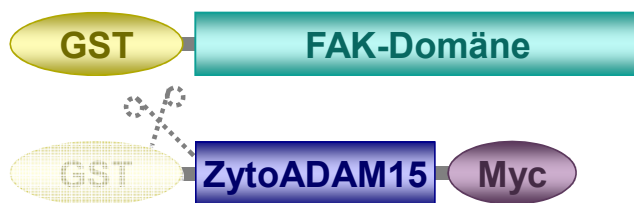


Abbildung 15: Schematische Darstellung der rekombinanten Proteine GST-FAK und ZytoADAM15. Die verschiedenen FAK-Domänen 33-355, 422-676 und 707-913 und die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), die zusätzlich am C-Terminus mit einem Myc-*tag* versehen war, wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden mittels GSH-Sepharose affinitätsaufgereinigt und bei der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 der GST-*tag* durch den proteolytischen Verdau mit PreScission Protease entfernt.

Nach Affinitätsaufreinigung der rekombinanten Proteine mittels GSH-Sepharose wurde die Größe der Proteine und der korrekte Leserahmen mittels SDS-PAGE und Immunblot überprüft. Dafür wurden 500 ng der Proteine mit GST-*tag* im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 16A). Es zeigte sich, dass die errechneten mit den detektierten Molekulargewichten übereinstimmten, welche bei ca. 52 kDa für die FAK-Domäne 707-913, 60 kDa für die FAK-Domäne 33-422, 56 kDa für die FAK-Domäne 422-676 und 42 kDa für die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 lagen. Für die weitere Kontrolle der korrekten Expression wurden je 25 ng der GST-Fusionsproteine im Immunblot mittels anti-GST Antikörpern untersucht (Abbildung 16B). Analog zum SDS-Gel zeigte sich die Expression der verschiedenen Fusionsproteine bei den jeweils errechneten korrekten Molekulargewichten und im korrekten Leserahmen.

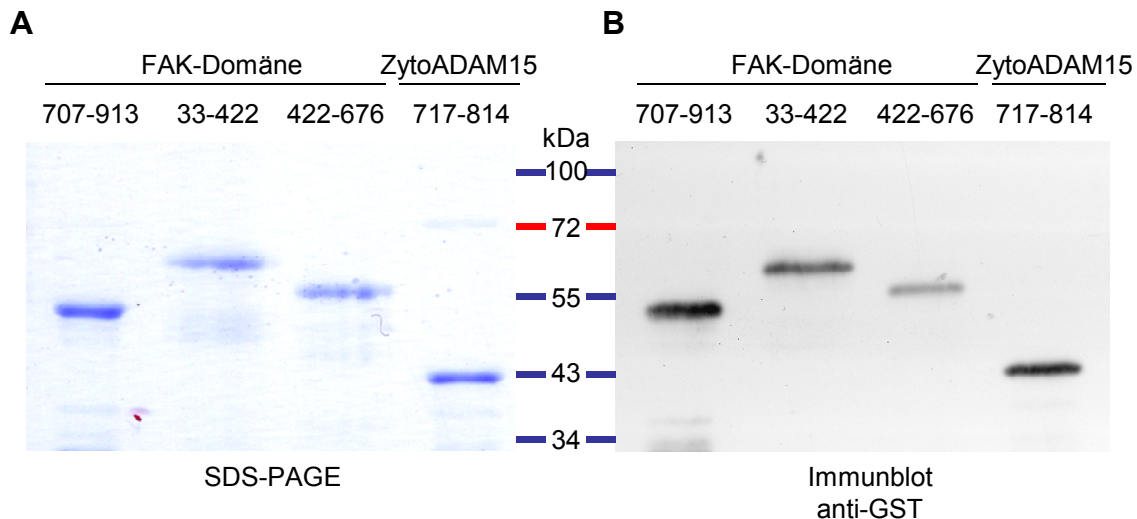


Abbildung 16: Analyse der rekombinanten Proteine von FAK-Domänen und ZytoADAM15. (A) 250 ng der aufgereinigten GST-Fusionsproteine (FAK-Domänen 33-355, 422-676 und 707-913 und die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15)) wurden elektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Alle Proteine sind bei den jeweils errechneten Molekulargewichten zu detektieren. (B) Für den Immunblot wurden 25 ng der GST-Fusionsproteine im SDS-Gel aufgetrennt. Unter Verwendung von anti-GST Antikörpern konnten analog zum Coomassie-gefärbten SDS-Gel alle rekombinanten GST-Fusionsproteine bei den errechneten Molekulargewichten detektiert werden.

Der GST-*tag* der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15) wurde nach der Affinitätsaufreinigung direkt an der GSH-Sepharose mittels PreScission Protease entfernt und das resultierende Protein im SDS-Gel und Immunblot kontrolliert. Das aufgereinigte ZytoADAM15 wies ein Molekulargewicht von ungefähr 17 kDa auf (Abbildung 17A). Im Immunblot ließ sich das zusätzlich mit einem Myc-*tag* versehene ZytoADAM15 sowohl mit Antikörpern gegen den Myc-*tag* (Abbildung 17B) als auch mit Antikörpern gegen die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (Abbildung 17C) nachweisen.

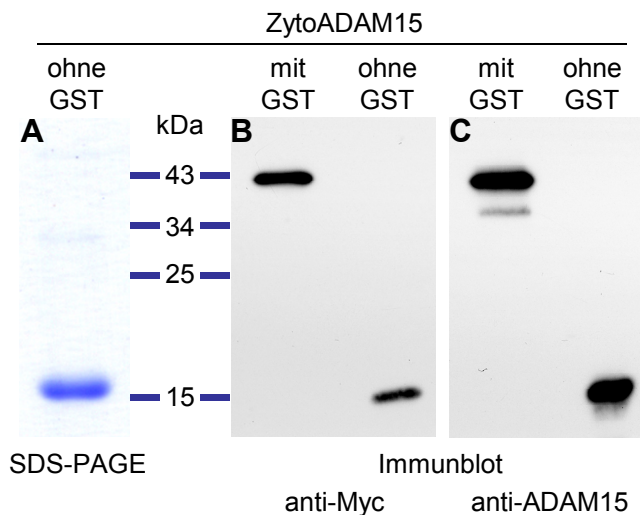


Abbildung 17: Analyse des rekombinanten Proteins ZytoADAM15. (A) 500 ng des aufgereinigten rekombinanten Proteins der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), bei dem der GST-*tag* mittels PreScission Protease entfernt wurde (ohne GST), wurden elektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das Protein ist bei dem errechneten Molekulargewicht von 17 kDa zu detektieren. (B, C) Für den Immunblot wurden 25 ng des rekombinanten Proteins ZytoADAM15 vor (mit GST) als auch nach dem proteolytischen Verdau (ohne GST) mit Antikörpern gegen den Myc-*tag* (B) bzw. gegen die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (C) im Immunblot detektiert, wobei die Proteine von beiden Antikörpern analog zum SDS-Gel bei den errechneten Molekulargewichten und im richtigen Leserahmen detektiert wurden.

3.2.1.2 Bindung von ADAM15 an die FAK-Domäne 707-913 im *Dot Blot*

Die Bindung von FAK an ADAM15 wurde anhand der rekombinant exprimierten Proteine im *Dot Blot* untersucht. Dazu wurden die rekombinanten GST-FAK-Domänen in ansteigender Konzentration von 25-150 ng auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und diese mit 2 µg/ml der rekombinanten mit einem Myc-*tag* versehenen zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), bei der der GST-*tag* proteolytisch entfernt war, in Lösung inkubiert. Das an der jeweiligen FAK-Domäne auf der Nitrozellulosemembran gebundene ZytoADAM15 wurde mittels gegen den Myc-*tag* gerichteten Antikörpern detektiert. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass das ADAM15-Fragment an die immobilisierte GST-FAK-Domäne 707-913 konzentrationsabhängig gebunden hat, wohingegen keine Bindung an die GST-FAK-Domänen 33-355 und 422-676 detektiert werden konnte (Abbildung 18A).

Um die gleichmäßige Beladung der Nitrozellulosemembran mit den GST-FAK-Domänen zu kontrollieren, wurde die Membran mit anti-GST-Antikörpern inkubiert. Es zeigte sich an fast allen Positionen ein positives, konzentrationsabhängiges Signal (Abbildung 18B). Das Ergebnis aus dem *Dot Blot* zeigt deutlich, dass die Domäne 707-913 der FAK mit der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 interagiert.

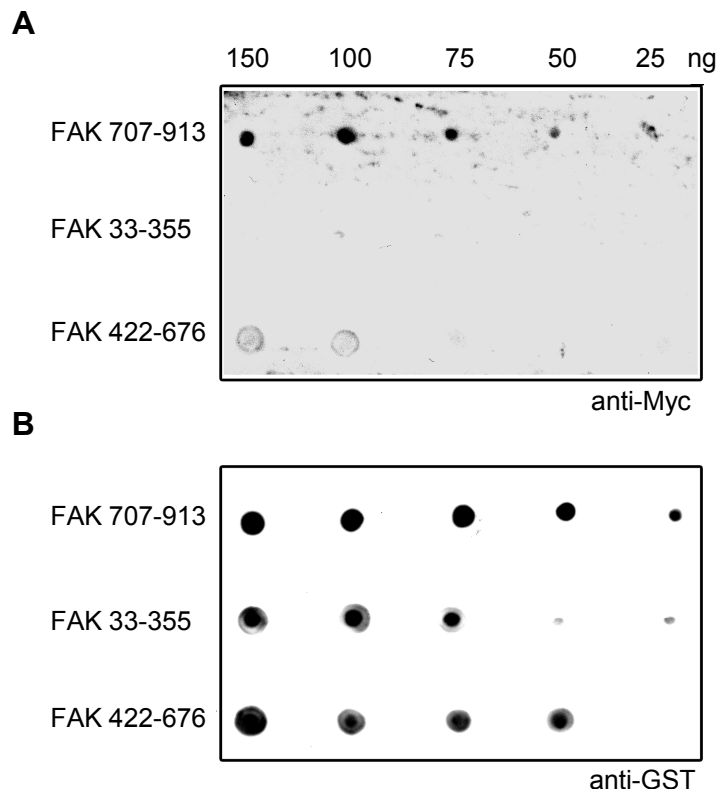


Abbildung 18: Analyse der Bindung von FAK und ADAM15 mittels *Dot Blot*. (A) Rekombinante GST-FAK-Domänen wurden in der angegebenen Menge auf die Nitrozellulosemembran aufgebracht und mit rekombinanter zytoplasmatischer Domäne von ADAM15 mit Myc-tag (ZytoADAM15) inkubiert. Die Bindung von ZytoADAM15 an die GST-FAK-Domänen wurde mit Antikörpern gegen den Myc-tag detektiert, wobei sich nur bei der FAK-Domäne 707-913 ein konzentrationsabhängiges Signal ergab und keine Bindung von ADAM15 an die FAK-Domänen 33-355 und 422-676 detektiert werden konnte. (B) Die Beladungskontrolle, bei der die abgewaschene Membran mit anti-GST Antikörpern inkubiert wurde, zeigt an fast allen Positionen ein positives, konzentrationsabhängiges Signal.

3.2.1.3 Bindung der FAK an ADAM15 im *Pulldown Assay*

Um die Interaktion von ADAM15 mit FAK anhand der rekombinanten Proteine mit einer weiteren Methode zu untersuchen, wurde ein *Pulldown Assay* mit den rekombinanten FAK-Domänen und dem mit Myc-tag versehenen ZytoADAM15 durchgeführt. Dafür wurden jeweils 50 oder 100 ng der rekombinant exprimierten GST-FAK-Domänen 707-913, 33-355 und 422-676 zusammen mit 50 bzw. 100 ng ZytoADAM15 mit Myc-tag, bei dem der GST-tag proteolytisch entfernt war, in T/C28a4-Zelllysate inkubiert und mittels GSH-Sepharose präzipitiert. Die Detektion von gebundenem ZytoADAM15 mit Myc-tag erfolgte mittels anti-Myc Antikörpern im Immunblot. Analog zu den Ergebnissen im *Dot Blot* zeigte sich nur bei der Präzipitation der GST-FAK-Domäne 707-913 bei beiden eingesetzten Proteinmengen eine starke Bindung der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von ADAM15,

wohingegen bei den GST-FAK-Domänen 33-355 und 422-676 kein Signal detektiert werden konnte (Abbildung 19).

Die Kontrolle der präzipitierten Menge der GST-FAK-Domänen, bei der der abgewaschene Western Blot mit anti-GST Antikörpern inkubiert wurde, zeigte, dass alle GST-FAK-Domänen gleichermaßen durch die GSH-Sepharose präzipitiert wurden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 nur an die Domäne 707-913 von FAK bindet.

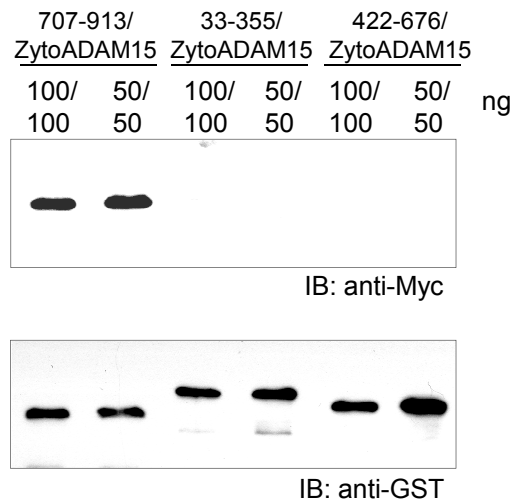


Abbildung 19: Detektion der Interaktion von ADAM15 und FAK mittels *Pulldown Assay*. Jeweils 50 oder 100 ng rekombinante GST-FAK-Domäne 707-913, 33-355 oder 422-676 wurde zusammen mit 50 bzw. 100 ng der rekombinanten, mit Myc-tag versehenen zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), bei der der GST-tag proteolytisch entfernt war, zu einem Chondrozyten-Zelllysats geben und mittels GSH-Sepharose präzipitiert. Die Bindung von ZytoADAM15 an eine GST-FAK-Domäne wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Präzipitate im SDS-Gel mittels Immunblot (IB) mit anti-Myc Antikörpern detektiert. Nur mit der GST-FAK-Domäne 707-913 ist eine signifikante Bindung von ZytoADAM15 zu detektieren. Zur Kontrolle der Präzipitation der GST-FAK-Domänen wurde der abgewaschene Immunblot mit anti-GST Antikörpern inkubiert.

3.2.2 *Mammalian Two-Hybrid* zur Untersuchung der Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15

Um die Interaktion der FAK und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 *in vivo* in eukaryotischen Zellen zu zeigen, wurde die *Mammalian Two-Hybrid* (M2H)-Technik verwendet. Die einzelnen Domänen der FAK wurden je in den *bait*-Vektor pCMV-BD kloniert: die FERM-Domäne (33-355), die Kinase-Domäne (422-676), die Linker-Region (707-913), die gesamte C-terminale Region (707-1052, bestehend aus der Linker-Region und der FAT-Domäne) und die FAT-Domäne (913-1052) (Abbildung 20A). Die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 wurde in den *prey*-Vektor pCMV-AD kloniert. *Bait*- und *prey*-Vektor wurden

zusammen mit einem induzierbaren *Firefly* Luziferase-Reporterplasmid und einem *Renilla* Luziferase-Kontrollplasmid in HEK 293T-Zellen ko-transfiziert. Die 48 h nach der Transfektion erfolgte Messung der Aktivität transkribierter *Firefly* Luziferase diente als ein quantitativer Indikator der Proteininteraktion.

Die Analyse der Daten ergab, dass ADAM15 und der C-terminale Bereich (Aminosäure 707-1052) der FAK im *in vivo* Experiment aneinander binden, wohingegen keine Bindung mit der FERM (33-355)- oder Kinase-Domäne (422-676) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 20B). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen ADAM15 und dem Linker-Bereich 707-913 und nicht der FAT-Domäne (913-1052) der FAK besteht (Abbildung 20B).

Für die genauere Kartierung des Bereichs der Linker-Region der FAK, der an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 bindet, wurden kleinere Fragmente der Linker-Region 707-913 kloniert, die C-terminal und/oder N-terminal um 23 - 143 Aminosäuren verkürzt waren (Abbildung 20D) und mittels der *Mammalian Two-Hybrid* Methode untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass sich die Bindung der FAK an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 auf die kleinstmögliche Sequenz von Aminosäure 730-790 der FAK eingrenzen ließ. Dieses Fragment wies eine Bindung von $99,9 \pm 20,8 \%$ an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 auf, die vergleichbar mit der Bindung des vollständigen Linker-Bereichs 707-913 von 100 % ist. Ebenso wies das lediglich C-terminal verkürzte Fragment der Linker-Region (707-850) eine vergleichbar hohe Bindung auf.

Wurde das Fragment 730-790 N- oder C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt (730-780 und 740-790), reduzierte sich die Bindung um ungefähr 70 % (Abbildung 20C und E). Eine weitere N-terminale Verkürzung um 10 oder 30 Aminosäuren resultierte trotz C-terminaler Verlängerung bis Aminosäure 850 in einer weiteren Reduktion der Bindung der Fragmente 750-850 und 770-850.

Dieses Ergebnis zeigt, dass der Aminosäurenbereich 730-790 in der Linker-Region der FAK essentiell für die Bindung der FAK an ADAM15 ist.

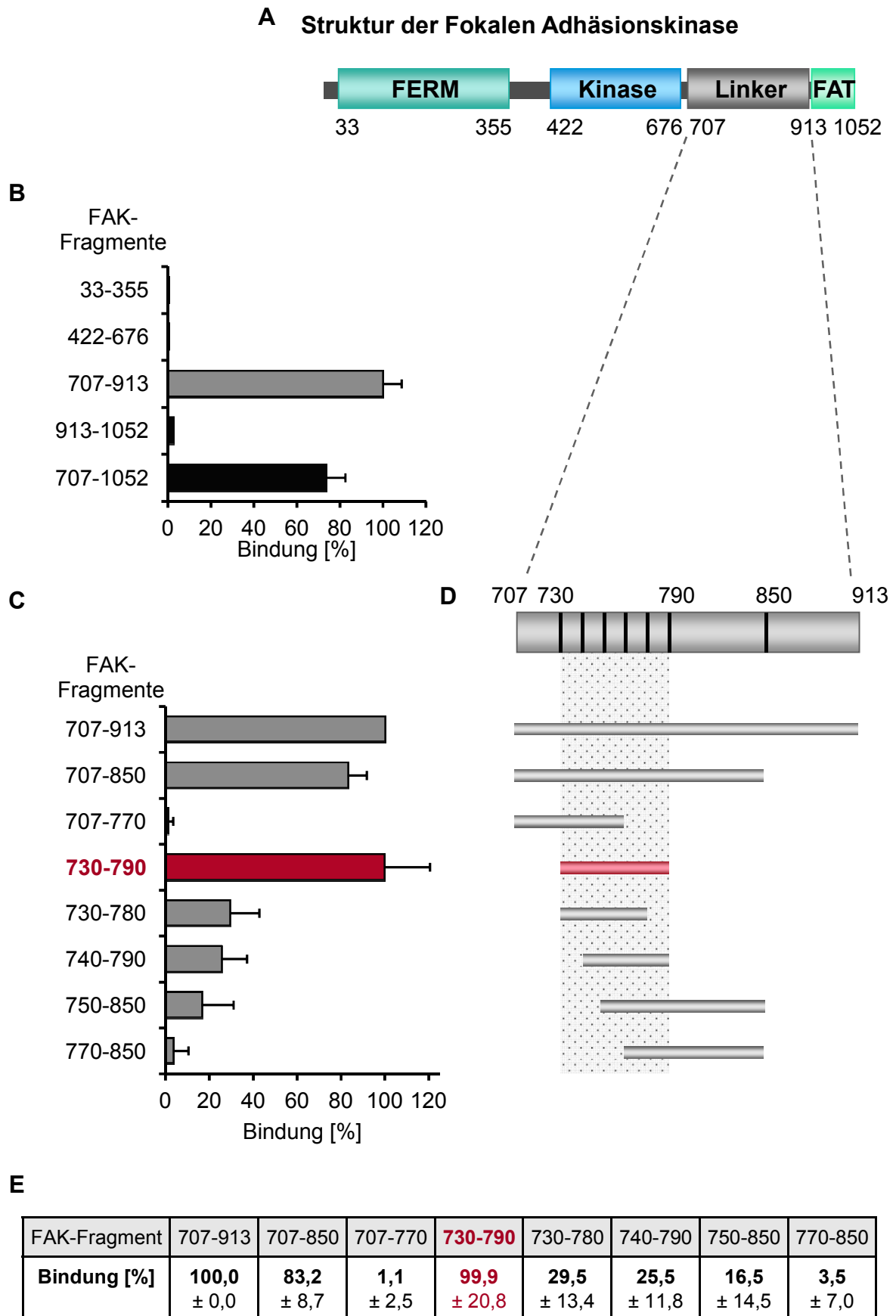


Abbildung 20: Mammalian Two-Hybrid-Assay zur genaueren Kartierung des Aminosäurenbereichs von FAK-Fragmenten, die an die zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 binden. (A)

Schematische Darstellung der Domänen-Struktur der FAK. **(B)** Die FAK-Fragmente wurden in den *bait*-Vektor, die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 in den *prey*-Vektor kloniert, zusammen mit einem *Firefly* Luziferase-Vektor in HEK 293T-Zellen transfiziert und im *Mammalian Two-Hybrid*-Assay analysiert. Die Interaktion der FAK mit der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 lässt sich auf die C-terminale Linker-Region (Aminosäuren 707-913) eingrenzen, während keine Bindung von der FERM-, Kinase- oder FAT-Domäne beobachtet werden konnte. **(C)** Die genauere Kartierung der Domäne 707-913 der FAK ergab einen Bereich von 730-790 (rot) als den minimal notwendigen Aminosäurenbereich für die Bindung an ADAM15, die genauso stark wie die Bindung von ADAM15 mit dem FAK-Fragment 707-913 war. Schon eine Verkürzung um 10 Aminosäuren N- oder C-terminal verringerte die Bindung von FAK an ADAM15 um ungefähr 70 %. **(D)** Schematische Darstellung der FAK-Fragmente zur genaueren Kartierung des Bindungsbereichs der Linker-Region 707-913, wobei der für die Bindung an ADAM15 notwendige minimale Aminosäurenbereich 730-790 rot hervorgehoben ist. **(E)** Die Tabelle zeigt die durchschnittlichen Bindungswerte in % (\pm Standardabweichung) von 5 wiederholten Experimenten. Die gemessenen *Firefly*-Luziferase-Werte wurden gegen die Werte, die von einem ko-transfizierten *Renilla*-Luziferase Kontrollplasmid erhalten wurden, normalisiert. Die Werte des FAK-Fragments 707-913, das die stärkste Bindung an ADAM15 aufwies, wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der übrigen Fragmente dazu in Bezug errechnet.

3.2.3 Detektion der Ko-Lokalisation von ADAM15 und der Fokalen Adhäsionskinase

Um die Bindung von ADAM15 und der FAK auch auf zellulärer Ebene *in situ* nachzuweisen, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von ADAM15 und FAK durchgeführt. ADAM15-transfizierte T/C28a4 Zellen und humane OA-Chondrozyten wurden auf mit Kollagen Typ II (CII) beschichteten Objektträgern ausgesät, um Fokalkontakte zu induzieren, mit anti-ADAM15 und anti-FAK Antikörpern doppelt gefärbt und im Konfokalmikroskop aufgenommen. ADAM15 wurde sowohl an der Plasmamembran in Zellausläufern als auch um den Zellkern im Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER) in mit ADAM15 transfizierten T/C28a4 Chondrozyten als auch in primären OA-Chondrozyten angefärbt (Abbildung 21A und B). Die FAK war neben einer diffusen zytoplasmatischen Anfärbung sehr distinkt in Fokalkontakten detektierbar (Abbildung 21C und D). In diesen Fokalkontakten der ADAM15-transfizierten Zellen und der primären OA-Chondrozyten konnte eine Ko-Lokalisation der FAK mit ADAM15 gezeigt werden (Abbildung 21E und F).

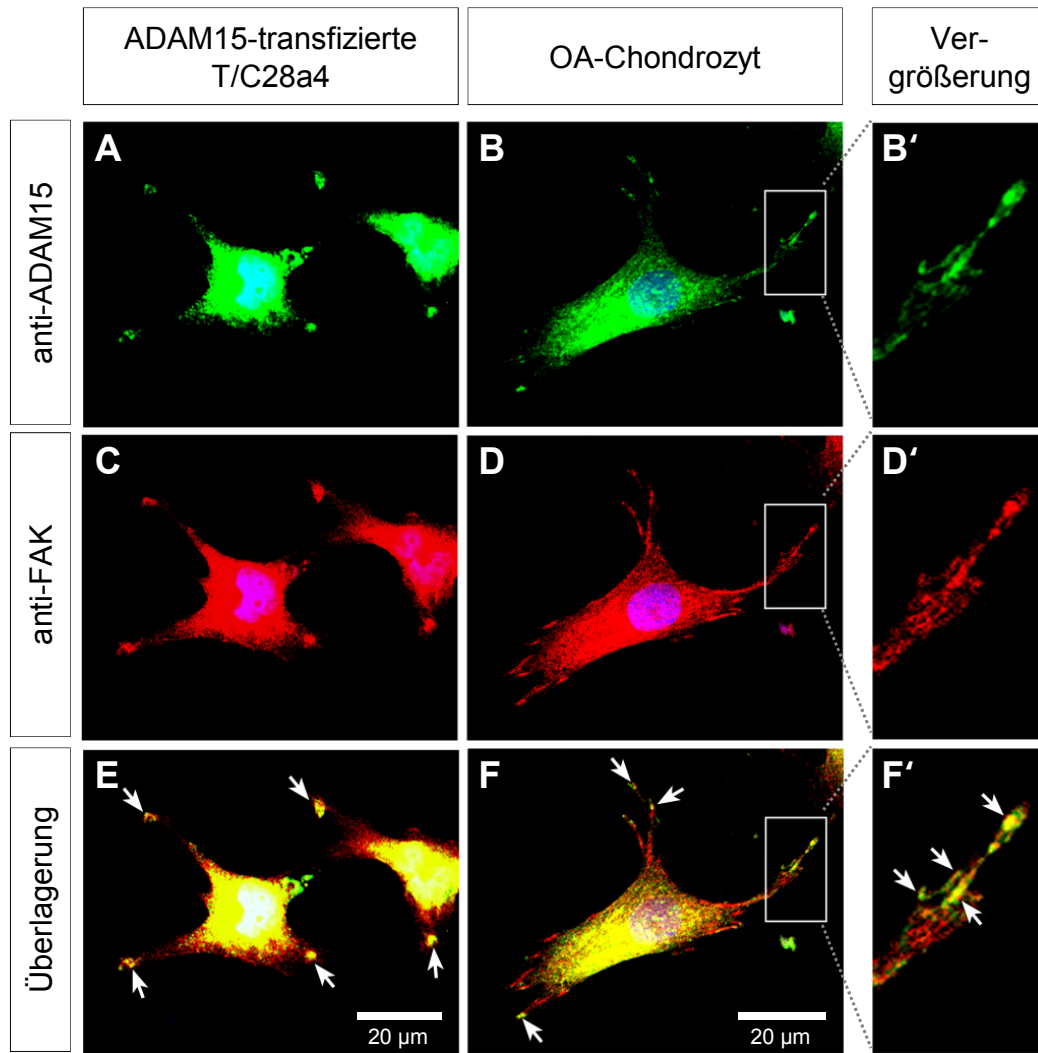


Abbildung 21: Ko-Lokalisation von ADAM15 und FAK in ADAM15-transfizierten T/C28a4 Chondrozyten und OA-Chondrozyten. (A-F) ADAM15-transfizierte T/C28a4 Chondrozyten (A, C, E) und OA-Chondrozyten (B, D, F) wuchsen auf CII-beschichteten Objektträgern auf, die fixierten Zellen wurden immunfluoreszent mit Ziege anti-ADAM15 und murinen anti-FAK Antikörpern doppelt gefärbt und den Alexa Fluor 488 konjugierten anti-Ziege (in grün) bzw. Alexa Fluor 594 konjugierten anti-Maus (in rot) Sekundärantikörpern visualisiert, die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Zellen mittels Konfokalmikroskopie aufgenommen. ADAM15 wurde an der Plasmamembran in Zellausläufern sowohl in ADAM15-transfizierten T/C28a4 Chondrozyten und OA-Chondrozyten gefärbt (A, B), die FAK ließ sich in einer typischen strichförmigen Färbung nachweisen (C, D). Die Überlagerung beider Färbungen ergab die Ko-Lokalisation von ADAM15 und der FAK in Fokalkontakten (E, F, weiße Pfeile). Ein vergrößerter Ausschnitt des weiß umrandeten Bereiches aus A, D und F ist in A', D' und F' dargestellt, Ko-Lokalisationsstellen von ADAM15 und der FAK wurden mit weißen Pfeilen markiert (F').

3.2.4 Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase nach Induktion von genotoxischem Stress

Wie von Böhm *et al.* 2010 [94] gezeigt, hat die Expression von ADAM15 in Chondrozyten eine anti-apoptotische Wirkung nach Applikation eines genotoxischen Stresses. Zur weiteren Analyse dieser Beobachtung wurde die FAK-Phosphorylierung in Abhängigkeit von ADAM15 nach Induktion von genotoxischem Stress durch Camptothecin untersucht. T/C28a4 Chondrozyten, die mit ADAM15 oder Kontrollvektor transfiziert waren, wurden für 15-60 min mit 2 μ M Camptothecin stimuliert, lysiert und im Immunblot mit Antikörpern gegen die verschiedenen phosphorylierten Tyrosinreste der FAK analysiert. Ein verstärktes, dauerhaftes Phosphorylierungssignal der FAK an den Tyrosinresten Y861, Y576 und Y397 wurde in ADAM15-transfizierten Zellen in allen gemessenen Zeitpunkten festgestellt (ungefähr 2,5-fach höheres Phosphorylierungsniveau aller drei Tyrosinreste verglichen mit dem der Vektorkontrolle) (Abbildung 22). Die mit Kontrollvektor transfizierten Zellen aktivierten die FAK nicht wesentlich über das Grundniveau hinaus. Diese Ergebnisse weisen deutlich auf eine entscheidende Beteiligung von ADAM15 an der erhöhten FAK-Phosphorylierung nach Induktion von genotoxischem Stress hin.

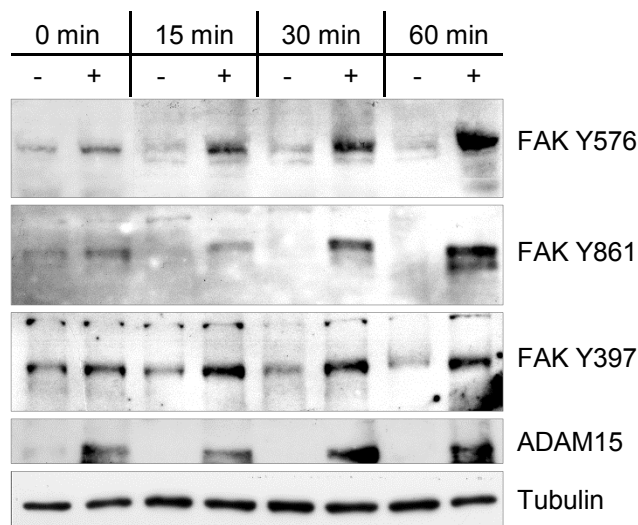


Abbildung 22: Verstärkte Phosphorylierung der FAK in ADAM15-transfizierten Zellen nach Stimulation mit Camptothecin. Mit ADAM15 (+) oder Kontrollvektor (-) transfizierte TC28a/4 Chondrozyten wurden für 15-60 min mit 2 μ M Camptothecin inkubiert, lysiert und mittels Immunblot mit spezifischen gegen phosphoryliertes FAK gerichteten Antikörpern analysiert. Eine verstärkte Phosphorylierung der FAK an den Tyrosinresten Y576/577, Y861 und Y397 als Folge der Stimulation konnte bei den mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle detektiert werden. Die Expression von ADAM15 wurde jeweils mit gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 gerichteten Antikörpern und die gleichmäßige Beladung mit anti-Tubulin Antikörpern kontrolliert. Die Abbildung ist repräsentativ für mindestens 5 wiederholte Experimente.

Um die Bedeutung von ADAM15 bei der FAK-vermittelten Signaltransduktion in primären humanen Chondrozyten zu zeigen, wurden OA-Chondrozyten im genotoxischen Stressmodell untersucht. ADAM15 wurde in den OA-Chondrozyten für 40 h mittels zwei verschiedener spezifischer siRNAs (I oder II) herab reguliert bzw. die Zellen mit unspezifischer siRNA (N) oder nur Transfektionsreagenz (0) behandelt, was zu einer ADAM15-Herabregulation um 85 % mit beiden spezifischen siRNAs führte (Abbildung 23A) [94]. Anschließend wurden die Zellen für 15-30 min mit 2 μ M Camptothecin inkubiert, lysiert und im Immunblot mit Antikörpern gegen die Tyrosinreste Y576/577, Y861 und Y397 der FAK analysiert. Wenn die Expression von ADAM15 durch das Einsetzen unspezifischer siRNA oder nur Transfektionsreagenz nicht reduziert war, zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung aller untersuchten Tyrosinreste der FAK nach genotoxischem Stress durch Camptothecin (Abbildung 23B: N und 0). Wurde ADAM15 allerdings durch die siRNAs I oder II herab reguliert, stieg die Phosphorylierung im Vergleich zu den ADAM15-exprimierenden Zellen nicht an, sondern blieb auf dem Niveau nicht-stimulierter Zellen (Abbildung 23B: I und II), was darauf hinweist, dass ADAM15 eine wichtige Rolle bei der FAK-Aktivierung nach Induktion von genotoxischem Stress in Chondrozyten besitzt.

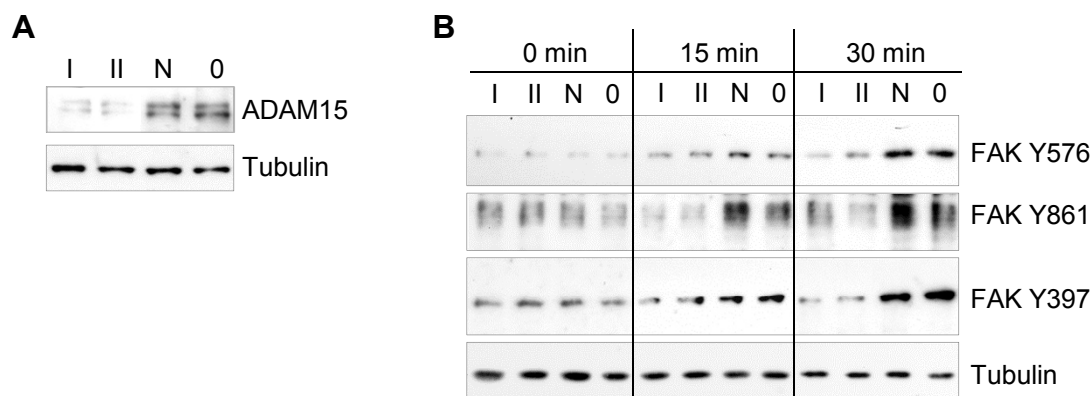


Abbildung 23: Verstärkte Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase in OA-Chondrozyten nach Stimulation mit Camptothecin. (A, B) ADAM15 wurde mittels spezifischer siRNAs I und II, nicht funktioneller siRNA (N) oder nur mit Transfektionsreagenz (0) in OA-Chondrozyten herunter reguliert. (A) Die Expression von ADAM15 wurde im Immunblot überprüft und ist in den Zellen, in denen ADAM15 herab reguliert ist (I und II) um 85 % schwächer als in Zellen, die mit nicht funktioneller siRNA (N) oder nur Transfektionsreagenz (0) inkubiert wurden. (B) Die Zellen wurden 15 und 30 min mit 2 μ M Camptothecin inkubiert, lysiert und mittels Immunblot analysiert. Mit spezifischen gegen phosphoryliertes FAK gerichteten Antikörpern ist eine stärkere Phosphorylierung der Tyrosinreste an Position Y576/577, Y861 und Y397 bei den Zellen zu detektieren, bei denen ADAM15 exprimiert wird (N und 0) im Vergleich zu den ADAM15-herunter regulierten Zellen (I und II). Die Beladung wurde mittels anti-Tubulin Antikörpern kontrolliert. Die Abbildung ist repräsentativ für 5 Versuche mit verschiedenen primären OA-Chondrozyten.

3.2.5 Signaltransduktion eines chimären IL2R α /ZytoADAM15 Konstrukts

Die α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (IL2R α , CD25), die in der Lage ist Interleukin-2 (IL-2) zu binden aber über keine intrinsische Signal-auslösende Fähigkeit verfügt, wurde an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 fusioniert (IL2R α /ZytoADAM15) und stabil in T/C28a4 Chondrozyten transfiziert, um zu untersuchen, ob die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 nach IL-2-Stimulation Signale weiterleiten kann. Dafür wurden die mit dem chimären Konstrukt transfizierten Zellen für 1-2 min mit 100 IU/ml IL-2 stimuliert, lysiert und im Immunblot mit Antikörpern gegen die verschiedenen phosphorylierten Tyrosinreste der FAK analysiert. Analog zu den Signaltransduktionsexperimenten der mit ADAM15-transfizierten Zellen, konnte ebenfalls eine verstärkte Phosphorylierung der FAK an allen drei Tyrosinresten Y397, Y576 und Y861 nach IL-2-Stimulation in den IL2R α /ZytoADAM15-exprimierenden Zellen detektiert werden, wohingegen IL-2 keinen Einfluss auf die niedrige basale FAK-Phosphorylierung aller untersuchten Tyrosinreste in den Kontrollvektor-transfizierten Zellen zeigte (Abbildung 24). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 in der Lage ist, über die FAK Signale in die Zelle weiter zu leiten.

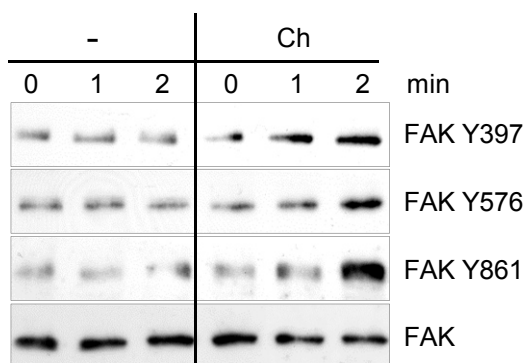


Abbildung 24: Verstärkte Phosphorylierung von FAK in den mit dem chimärem Konstrukt IL2R α /ZytoADAM15 transfizierten T/C28a4 Chondrozyten nach Stimulation mit IL-2. Die mit dem chimären Konstrukt aus IL2R α und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (Ch) oder Kontrollvektor (-) transfizierten TC28a/4 Chondrozyten wurden für 1-2 min mit 100 IU/ml IL-2 stimuliert und Zelllysate mittels Immunblot mit spezifischen gegen phosphorylierte Tyrosinreste der FAK gerichteten Antikörpern analysiert. Es konnte nach der Gabe von IL-2 eine stärkere Phosphorylierung der Tyrosinreste Y397, Y576/577 und Y861 bei den IL2R α /ZytoADAM15-transfizierten Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle detektiert werden. Die gleichmäßige Beladung wurde mit Antikörpern gegen nicht-phosphoryliertes FAK kontrolliert.

3.3 Funktion der Bindung des *Poly(A)-Binding Proteins* an ADAM15 während der Zelladhäsion

3.3.1 Identifizierung von PABP als Bindungspartner von ADAM15 mittels MALDI

Für die Identifikation weiterer zytoplasmatischer Interaktionspartner von ADAM15 wurden Ko-Immunpräzipitationen aus Lysaten von T/C28a4 Chondrozyten, die mit dem chimären Konstrukt aus der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 und der α -Untereinheit des Interleukin-2 Rezeptors (IL2R α /ZytoADAM15) oder mit Kontrollvektor transfiziert waren, mit gegen IL2R α (CD25) gerichteten Antikörpern durchgeführt. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteinbanden mit kolloidalem Coomassie gefärbt und ausgeschnitten (Abbildung 25A, B). Es konnte eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 72 kDa bei der mit dem chimären Konstrukt transfizierten Zelllinie im Gegensatz zur Vektorkontrolle detektieren werden (Abbildung 25B, Pfeil). Mittels der anschließenden MALDI-TOF Analyse (durchgeführt von Dr. Stefan Müller, Zentrale Bioanalytik (ZBA) an Zentrum für Molekulare Medizin der Universität Köln) wurde die ausgeschnittene Proteinbande als *Poly(A)-Binding Protein* (PABP) identifiziert. Um zu verifizieren, dass das identifizierte PABP mit der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 interagiert, wurde eine anti-CD25-Immunpräzipitation mit anschließendem Immunblot unter Verwendung von anti-PABP Antikörpern durchgeführt. Lediglich bei den mit dem chimären IL2R α /ZytoADAM15 transfizierten Zellen konnte im Gegensatz zur Vektorkontrolle PABP präzipitiert werden (Abbildung 25C). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass PABP ein Interaktionspartner von ADAM15 ist.

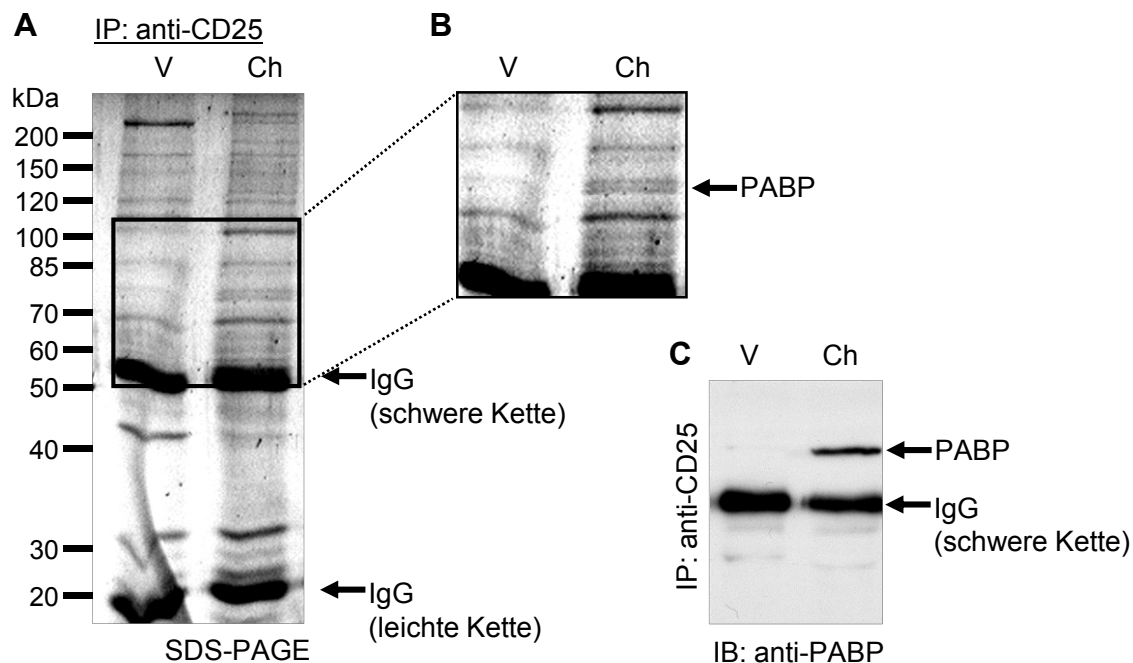


Abbildung 25: Identifikation von PABP als Interaktionspartner von ADAM15. (A) Lysate von mit Kontrollvektor (V) oder dem chimären Konstrukt IL2Rα/ZytoADAM15 (Ch) transfizierten T/C28a4 Chondrozyten wurden mittels anti-CD25 Antikörpern immunpräzipitiert (IP), im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden gefärbt. (B) Die im vergrößerten Bereich markierte Proteinbande (Pfeil) wurde ausgeschnitten, mittels MALDI-TOF analysiert und als PABP identifiziert. (C) Aus Lysaten von IL2Rα/ZytoADAM15-transfizierten TC28a/4 Chondrozyten (Ch) wurden Immunpräzipitationen (IP) mit anti-CD25 Antikörpern durchgeführt und mittels Immunblot (IB) mit anti-PABP Antikörpern detektiert. Im Vergleich zur Vektorkontrolle (V) konnte nur bei den mit dem chimären Konstrukt transfizierten Chondrozyten (Ch) PABP präzipitiert werden.

3.3.2 Bestimmung der an ADAM15 bindenden Domäne des *Poly(A)-Binding Proteins*

3.3.2.1 Ko-Immunpräzipitation von PABP und ADAM15

Um nachzuweisen, dass der neu gefundene Interaktionspartner PABP tatsächlich an ADAM15 bindet, wurden Ko-Immunpräzipitationen mit T/C28a4 Chondrozyten, die das komplette ADAM15 exprimierten oder mit Kontrollvektor transfiziert waren (siehe 3.1), durchgeführt. Die Immunpräzipitation mit anti-PABP Antikörpern und nachfolgender Detektion des gebundenen ADAM15 im Immunblot mittels anti-ADAM15 Antikörpern ergab eine klare, deutliche Ko-Präzipitation von ADAM15 mit PABP bei den ADAM15-transfizierten Zellen, die bei mit Kontrollvektor transfizierten Chondrozyten nicht zu detektieren war (Abbildung 26A). Ebenfalls konnte bei Ko-Immunpräzipitationen in umgekehrter Reihenfolge, bei denen mit anti-ADAM15 Antikörpern präzipitiert und nachfolgend mit anti-PABP Antikörpern im Immunblot detektiert wurde, die Bindung von PABP an ADAM15 bestätigt

werden (Abbildung 26B, linkes Panel). Um auszuschließen, dass die Bindung von PABP an ADAM15 durch an PABP gebundene polyA-mRNA vermittelt wird, wurden die Zelllysate mit RNase A vorinkubiert, wiederum mit anti-ADAM15 Antikörpern präzipitiert und anti-PABP Antikörpern im Immunblot detektiert. Auch nach Zugabe der RNase war das Ergebnis das gleiche wie ohne RNase, denn PABP ließ sich aus den mit ADAM15 transfizierten Zellen präzipitieren (Abbildung 26B, rechtes Panel), was darauf schließen lässt, dass die polyadenylierte mRNA keinen Einfluss auf die Bindung von PABP und ADAM15 hat.

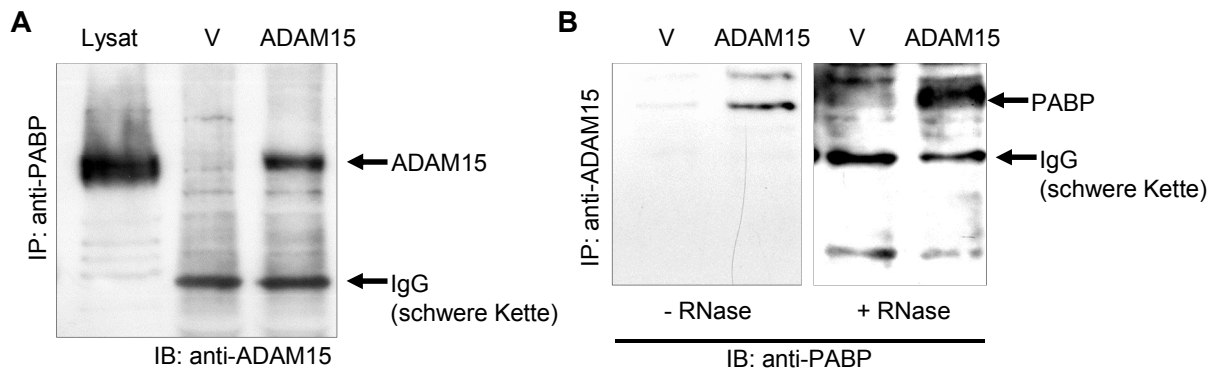


Abbildung 26: Präzipitation von PABP mit ADAM15. (A, B) Mit Lysaten von TC28a/4 Chondrozyten, die mit Kontrollvektor (V) oder ADAM15 (ADAM15) transfiziert waren, wurden Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt und mittels Immunblot (IB) analysiert. (A) Die Ko-IP mittels anti-PABP Antikörpern wurde im IB mit anti-ADAM15 Antikörpern detektiert und zeigte bei den ADAM15-transfizierten Zellen eine deutliche Ko-Präzipitation von ADAM15, während bei der Vektorkontrolle kein Signal zu detektieren war. Als Kontrolle wurde Lysat der ADAM15-transfizierten Zellen aufgetragen. (B) Um auszuschließen, dass eine Bindung von PABP an ADAM15 durch an PABP gebundene poly(A)mRNA vermittelt wird, wurden Zelllysate mit RNase A vorbehandelt. Sowohl ohne (- RNase) als auch mit RNase (+ RNase) ist im Vergleich zur Vektorkontrolle nur bei der IP aus den ADAM15-transfizierten Zellen PABP ko-präzipitierbar, was darauf schließen lässt, dass die Bindung von PABP an ADAM15 nicht RNA-vermittelt ist.

Um zu klären, ob die Bindung von PABP an ADAM15 tatsächlich vom intrazellulären zytoplasmatischen Teil von ADAM15 abhängt, wurden Lysate von T/C28a4-Chondrozyten, die das komplette ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne exprimierten (ADAM15 Δ Zyto), in Ko-Immunpräzipitationen mit Antikörpern, die gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 gerichtet sind, eingesetzt und das gebundene PABP im Immunblot mit anti-PABP Antikörpern detektiert. Für die Immunpräzipitationen wurden zwei aus verschiedenen Spezies stammende anti-ADAM15-Antikörper (Maus und Ziege) verwendet. Aus den mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen konnte sowohl mit den monoklonalen Maus-Antikörpern als auch mit den polyklonalen Ziege-Antikörpern PABP präzipitiert werden, wohingegen bei den mit ADAM15 Δ Zyto transfizierten Zellen kein PABP-Signal detektiert werden konnte (Abbildung 27). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass

die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 essentiell für die Ko-Präzipitation von PABP mit ADAM15 ist und es durch die Deletion der zytoplasmatischen Domäne zu keiner Interaktion mehr zwischen ADAM15 und PABP kommt.

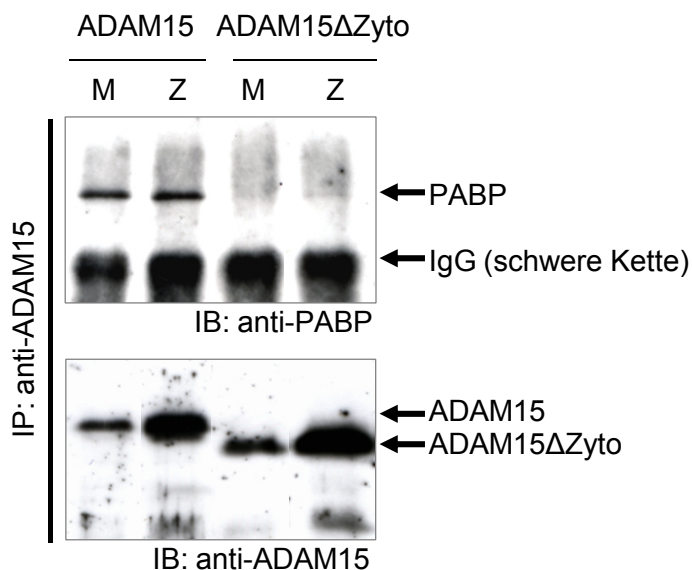


Abbildung 27: Bindung von PABP an ADAM15 in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15. Lysate aus T/C28a4 Chondrozyten, die mit dem kompletten ADAM15 oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne (ADAM15ΔZyto) transfiziert waren, wurden sowohl mit aus der Maus (M) als auch aus der Ziege (Z) stammenden anti-ADAM15 Antikörpern, die gegen den extrazellulären Bereich von ADAM15 gerichtet sind, immunpräzipitiert (IP) und im Immunblot (IB) mit anti-PABP Antikörpern detektiert. Mit beiden anti-ADAM15 Antikörpern konnte PABP in den Zelllysaten der mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen ko-präzipitiert werden, wohingegen in den Lysaten der mit ADAM15ΔZyto transfizierten Zellen kein PABP ko-präzipitiert wurde. Die Präzipitation von ADAM15 bzw. ADAM15ΔZyto wurde mit anti-ADAM15 Antikörpern, der gegen die Prodomäne von ADAM15 gerichtet war, kontrolliert.

3.3.2.2 ADAM15-PABP-Bindungsstudien anhand von rekombinanten Proteinen

3.3.2.2.1 Expression rekombinanter Domänen von PABP

Für die Proteinbindungsstudien von ADAM15 und PABP wurde die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 und verschiedene PABP-Domänen als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und mittels Bindungs-ELISA untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Domänen von PABP (siehe 1.4 Abbildung 7) *RNA recognition motive* 1 und 2 (RRM1 und 2, Aminosäurebereichen 1-192), die Prolin-reiche Region zusammen mit der C-terminalen PABC-Domäne (392-636), die Prolin-reiche Region (392-553) und die PABC-Domäne (552-636) als GST-Fusionsproteine exprimiert (Abbildung 28). Die Expression und Aufreinigung

der mit einem GST- und Myc-tag versehenen zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15) ist detailliert in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben.

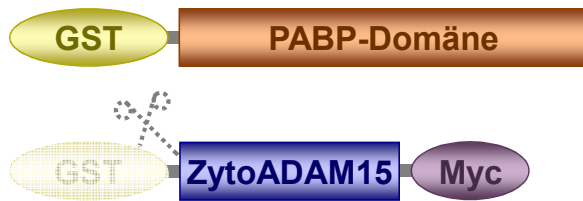


Abbildung 28: Schematische Darstellung der rekombinanten Proteine GST-PABP und ZytoADAM15. Die verschiedenen PABP-Domänen 1-192, 392-626, 392-553 und 552-636 und die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), die zusätzlich mit eine Myc-tag versehen war, wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden mittels GSH-Sepharose affinitätsaufgereinigt und bei der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 der GST-tag durch den proteolytischen Verdau mit PreScission Protease entfernt.

Nach Affinitätsaufreinigung der rekombinanten Proteine mittels GSH-Sepharose wurde die Größe der Proteine und der korrekte Leserahmen mittels SDS-PAGE und Immunblot überprüft. Dafür wurden 500 ng der Proteine mit GST-tag im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abbildung 29A). Es zeigte sich, dass die errechneten mit den detektierten Molekulargewichten übereinstimmten, welche bei ca. 50 kDa für die PABP-Domänen 1-192 und 392-553, 55 kDa für die PABP-Domäne 392-636, 34 kDa für die PABP-Domänen 392-470 und 553-636 und 42 kDa für die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 lagen. Für die weitere Kontrolle der korrekten Expression wurden je 25 ng der GST-Fusionsproteine im Immunblot mittels anti-GST Antikörpern untersucht (Abbildung 29B). Analog zum SDS-Gel zeigte sich die Expression der verschiedenen Fusionsproteine bei den jeweils errechneten korrekten Molekulargewichten und im korrekten Leserahmen.

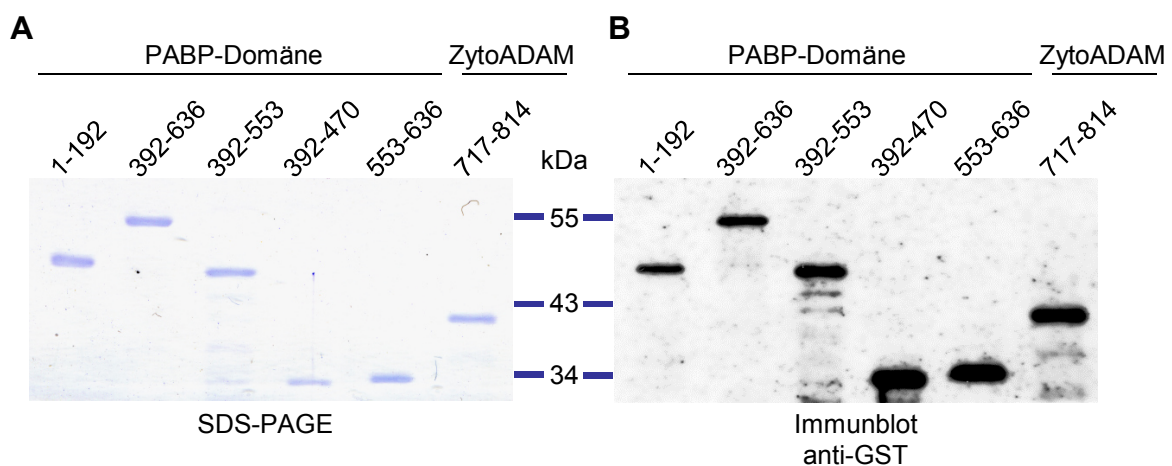


Abbildung 29: Analyse der rekombinanten Proteine der PABP-Domänen und ZytoADAM15. (A) 500 ng der aufgereinigten GST-Fusionsproteine (PABP-Domänen 1-192, 392-636, 392-553, 392-470, 553-636 und die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 (ZytoADAM)) wurden elektrophoretisch im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Alle Proteine sind bei den jeweils errechneten Molekulargewichten zu detektieren. (B) Für den Immunblot wurden 25 ng der GST-Fusionsproteine im SDS-Gel aufgetrennt. Unter Verwendung von anti-GST Antikörpern konnten analog zum Coomassie-gefärbten SDS-Gel alle rekombinanten GST-Fusionsproteine bei den berechneten Molekulargewichten detektiert werden.

3.3.2.2.2 Bindung von PABP an ADAM15 im ELISA

Die Bindung von PABP an ADAM15 wurde mittels ELISA untersucht. Dafür wurden je 500 nM der verschiedenen GST-PABP-Proteine mit in einer 96-well Mikrotiterplatte beschichtetem ZytoADAM15, bei welchem der GST-tag proteolytisch entfernt war, inkubiert und die Bindung anhand von HRP-gekoppelten anti-GST Antikörpern detektiert. Es zeigte sich, dass der gesamte C-terminale Bereich (392-636), bestehend aus der Prolin-reichen Domäne und der PABC-Domäne von PABP, an das immobilisierte ADAM15 bindet (Abbildung 30). Eine C-terminale Verkürzung dieses PABP-Fragments um die PABC-Domäne führte zu einer verbesserten Bindung der kompletten Prolin-reiche Domäne (392-553), was auf eine artifizielle Generierung eines rekombinanten Proteins mit besseren Bindungseigenschaften zurückzuführen sein könnte. Die PABC-Domäne allein (553-636) hingegen wies keine Bindung an ADAM15 auf. Wurde die am besten bindende Prolin-reiche Domäne 392-553 C-terminal um 83 Aminosäuren verkürzt, zeigte sich ebenfalls eine gute Bindung des PABP-Fragments 392-470 an ADAM15 von $87 \% \pm 67 \%$, wobei die hohe Standardabweichung auf eine instabile Konformation des artifiziell generierten Proteinfragments zurückzuführen sein könnte. Das N-terminale Protein-Fragment aus RRM1 und 2 (1-192) zeigte keine Bindung an ADAM15. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine klare Identifikation der Prolin-reichen Domäne (392-553) von PABP als die Bindungsregion von ADAM15.

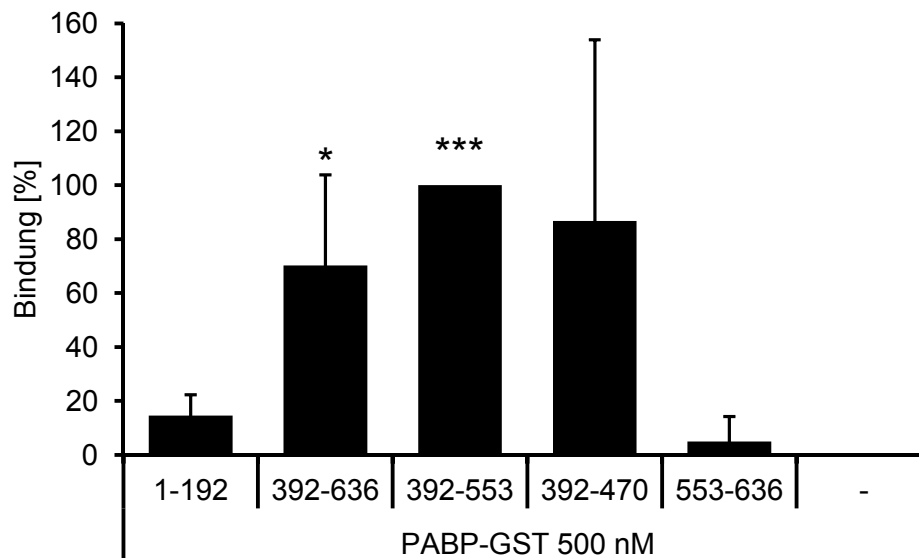


Abbildung 30: Bindung von rekombinanten GST-PABP-Domänen an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 im ELISA. 100 ng der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), bei welcher der GST-tag proteolytisch entfernt war, wurden auf eine Mikrotiterplatte beschichtet, mit 500 nM rekombinanten GST-PABP-Fragment inkubiert und gebundenes PABP mittels HRP-gekoppelten anti-GST Antikörpern detektiert. Die PABP-Domäne 392-553 wies die stärkste Bindung an ZytoADAM15 auf. Die Domänen 392-636 und 392-470 banden ebenfalls an ADAM15, wohingegen die Fragmente 1-192 und 553-636 keine Bindung aufwiesen. Im Diagramm sind die durchschnittlichen Werte mit Standardabweichung aus 5 wiederholten Versuchen dargestellt. Die Werte des am stärksten bindenden Fragments 392-553 wurden auf 100 % und die Werte der anderen Fragmente in Bezug dazu gesetzt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$ im Vergleich zur nicht bindenden PABP-Domäne 1-192.

Analog zum beschriebenen Bindungs-ELISA wurden die Bindungseigenschaften des am stärksten bindenden PABP-Fragments 392-553 untersucht. Die auf der Mikrotiterplatte immobilisierte rekombinante zytoplasmatische Domäne von ADAM15 wurde mit einer ansteigenden Konzentration (100-500 nM) der GST-PABP-Domäne 392-553 inkubiert. Das durch die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten anti-GST Antikörpern generierte Signal korrelierte eindeutig mit der Konzentration von eingesetztem PABP-Fragment 392-553, da es mit der eingesetzten Konzentration von 500 nM bis 150 nM stetig ab sank (Abbildung 31). Das PABP-Fragment 392-553 zeigt bei einer Konzentration von 500 nM mit einer gemessenen OD_{405} von 0,54 eine gute Bindung an ADAM15 im Vergleich zur Negativkontrolle des nicht bindenden Fragments 553-636, dessen OD_{405} -Wert bei 0,14 detektiert wurde. Auch bei einer Konzentration von 150 nM des Fragments 392-553 wurde noch eine Bindung detektiert, die mit einer gemessenen OD_{405} von 0,24 deutlich über der Negativkontrolle lag, was eine hohe Bindungsaffinität des PABP-Fragments 392-553 an ADAM15 im niedrigen nanomolaren Bereich zeigt.

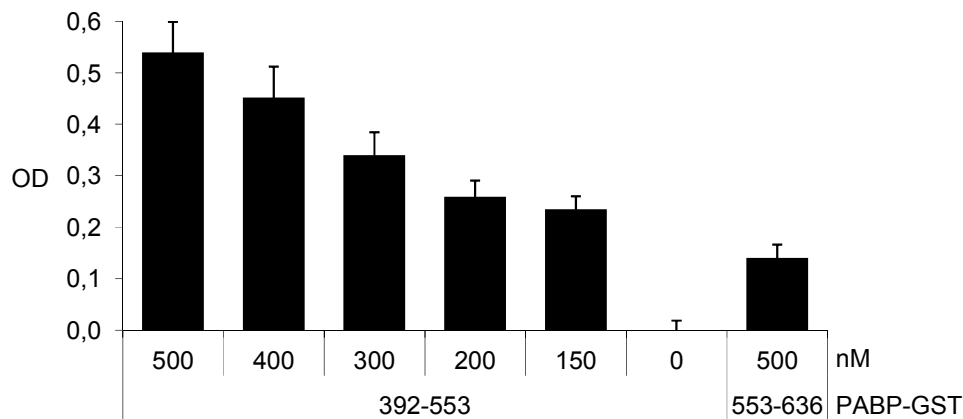


Abbildung 31: Konzentrationsabhängige Bindung der rekombinanten GST-PABP-Domäne 392-553 an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 im ELISA. Für den ELISA wurden 100 ng der rekombinanten zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (ZytoADAM15), bei der der GST-tag proteolytisch entfernt war, auf eine Mikrotiterplatte beschichtet, mit 0-500 nM rekombinantem GST-PABP-Fragment 392-553 inkubiert und die Bindung mittels HRP-gekoppelten anti-GST Antikörpern detektiert. Das Balken-Diagramm gibt die OD₄₀₅-Messung wieder, die zeigt, dass mit sinkender PABP-Menge auch die Signalstärke abnimmt. Die stark affine Bindung des PABP-Fragments 392-553 an ZytoADAM15 ist bei der Konzentration von 150 nM noch nachweisbar im Vergleich zu dem mit einer Konzentration von 500 nM eingesetzten PABP-Fragments 553-636, welches als Negativkontrolle diente.

Zusammenfassend zeigen die anhand der rekombinanten Proteine von ADAM15 und der verschiedenen Domänen von PABP durchgeführten Versuche, dass die Prolin-reiche Region 392-553 von PABP mit hoher Affinität an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 bindet.

3.3.2.3 *Mammalian Two-Hybrid*-Assay zur Untersuchung der Bindung von PABP an ADAM15

Um die Interaktion von PABP und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 *in vivo* in eukaryotischen Zellen zu zeigen, wurde die *Mammalian Two-Hybrid*-Technik (M2H) verwendet. Dafür wurden Vektoren, welche die zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 oder PABP-Fragmente kodierten, zusammen mit einem *Firefly* Luziferase- und einem *Renilla* Luziferase-Plasmid, welches der Kontrolle der gleichmäßigen Transfektionseffizienz diente, in HEK 293T-Zellen ko-transfiziert. Folgende PABP-Fragmente wurden für die M2H-Versuche in den *bait*-Vektor pCMV-BD kloniert: RRM1 und 2 (1-192), RRM3 und 4 (182-371), verschiedene Proteindomänen der Prolin-reichen Region (392-553, 392-470, 471-553), als auch 2 Fragmente aus der Prolin-reichen Region mit der PABC-Domäne (392-636, 471-636) und die PABC-Domäne (552-636) (Abbildung 32A, C). Die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 wurde in den *prey*-Vektor pCMV-AD kloniert. Als Negativkontrolle wurden die

Vektoren pBD-p53 und pAD-TRAF, deren exprimierte Proteine p53 und TRAF2 nicht miteinander interagieren, aus dem Stratagene-M2H-Kit eingesetzt. *Bait*- und *prey*-Vektor wurden zusammen mit einem induzierbaren *Firefly* Luziferase-Reporterplasmid und einem *Renilla* Luziferase-Kontrollplasmid in HEK 293T-Zellen ko-transfiziert. Die 48 h nach der Transfektion erfolgte Messung der Aktivität transkribierter *Firefly* Luziferase diente als ein quantitativer Indikator für die Proteininteraktion.

Es konnte gezeigt werden, dass der gesamte C-terminale Bereich (392-636), bestehend aus der Prolin-reichen Domäne und der PABC-Domäne, von PABP an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 bindet ($89,8 \pm 10,2 \%$) (Abbildung 32B, D). Allerdings führte die Deletion der C-terminalen PABC-Domäne nicht zu einer Reduktion der Bindung der kompletten Prolin-reichen Domäne (392-553), sondern zu einer verstärkten Bindung, weshalb die Bindung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 an dieses PABP-Fragment als 100 % gesetzt wurde. Wurde diese Prolin-reiche Domäne (392-553) C-terminal um 83 Aminosäuren verkürzt, zeigte sich ebenfalls eine gute Bindung von 88,4 % dieses PABP-Fragments (392-470) an ADAM15. Allerdings ergab die Auswertung von fünf durchgeführten Experimenten eine hohe Standardabweichung von $\pm 29,6 \%$, die auf eine instabile Konformation des artifiziell generierten Fusionsproteins zurückzuführen sein könnte. Keines der C-terminalen Fragmente von PABP, die den Aminosäurenbereich 392-470 nicht miteinschlossen, zeigte im Vergleich mit der definierten Negativkontrolle (p53 und TRAF2) eine Bindung an ADAM15. Somit wiesen weder das Proteinfragment 471-636 noch der C-terminale Bereich der Prolin-reichen Region alleine (471-553) oder die PABC-Domäne alleine (553-636) eine Bindung an ADAM15 auf. Auch die N-terminalen Protein-Fragmente aus RRM1 und 2 (1-192) bzw. RRM3 und 4 (182-371) zeigten keine Bindung an ADAM15.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Aminosäurenbereich 392-470 in der Prolin-reichen Region von PABP essentiell für die Bindung an ADAM15 ist und eine optimale Bindung mit der gesamten Prolin-reichen Domäne 392-553 detektierbar ist. Wie schon in den Proteinbindungsstudien anhand bakteriell exprimierter Proteine gezeigt, kann die Bindung der Prolin-reichen Region von PABP (392-470) an ADAM15 ebenfalls in eukaryotischen Zellen bestätigt werden.

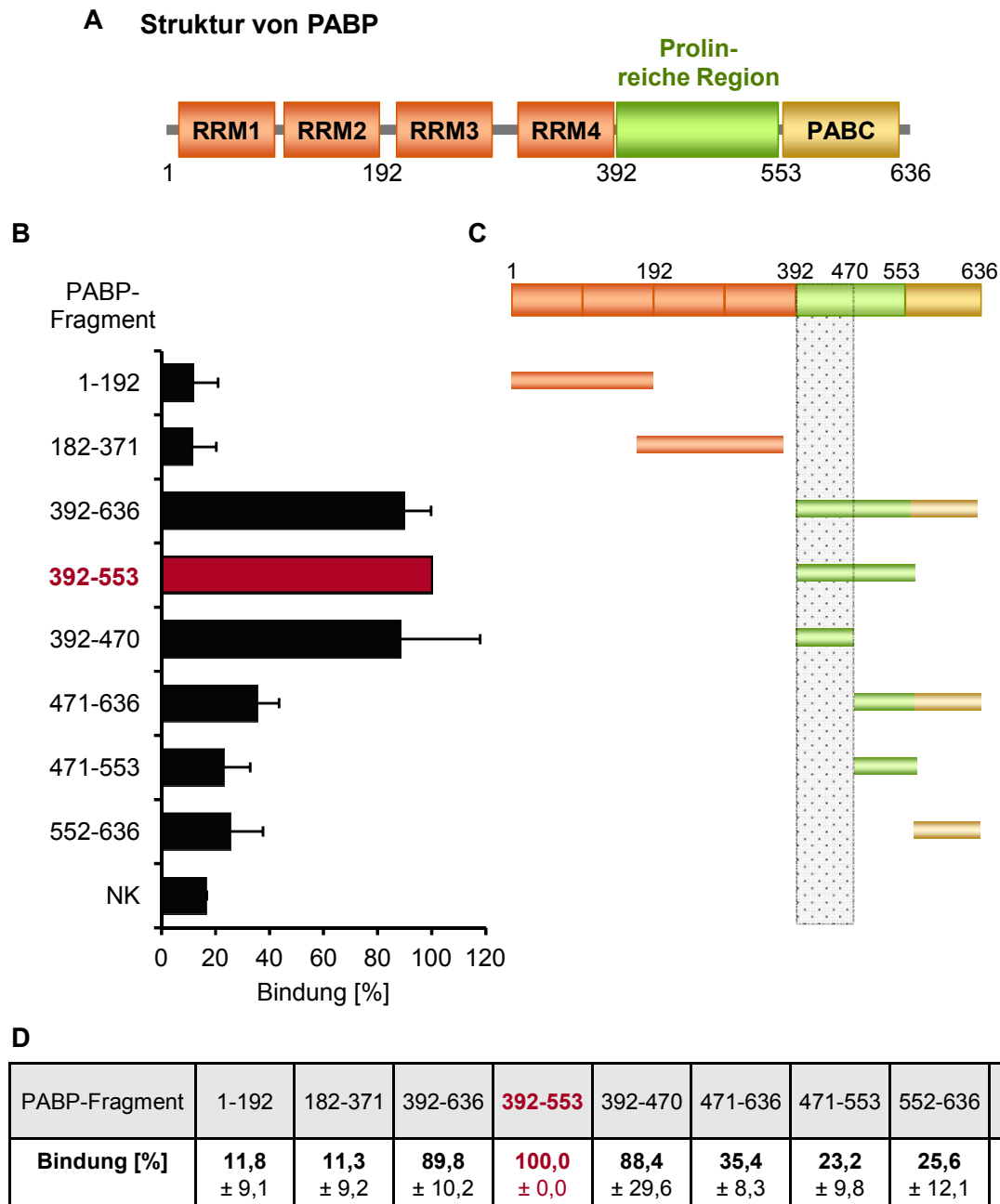


Abbildung 32: *Mammalian Two-Hybrid-Assay* (M2H) zur Kartierung des Aminosäurenbereichs von PABP-Fragmenten, der an die zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 bindet. (A) Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von PABP. (B) Die PABP-Domänen/-Fragmente wurden in den *bait*-Vektor, die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 in den *prey*-Vektor kloniert, zusammen mit einem *Firefly* Luziferase-Vektor in HEK 293T-Zellen transfiziert und im *Mammalian Two-Hybrid-Assay* analysiert. Die Interaktion von PABP mit der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 lässt sich auf Fragmente eingrenzen, die mindestens den Aminosäurenbereich 392-470 enthielten, während die Bindung der PABP-Domäne 392-553 an ADAM15 am stärksten war. Im Vergleich dazu zeigten Fragmente, die den Aminosäurenbereich 392-470 nicht enthielten, eine deutlich verringerte oder gar keine Interaktion, ebenso wie die aus dem M2H-Kit eingesetzte Negativkontrolle (NK). (C) Schematische Darstellung der Fragmente von PABP, die im M2H

eingesetzt wurden, wobei der minimale Bindungsbereich 392-470 grau unterlegt ist. (D) Die Tabelle zeigt die durchschnittlichen Bindungswerte (\pm Standardabweichung) von 5 wiederholten Experimenten der Bindung von ADAM15 mit den jeweiligen PABP-Fragmenten. Die gemessenen *Firefly*-Luziferase-Werte wurden gegen die Werte, die von einem ko-transfizierten *Renilla*-Luziferase Kontrollplasmid erhalten wurden, normalisiert. Die Werte des Fragments, das die stärkste ADAM15-Bindung aufwies (392-553), wurden auf 100 % gesetzt und die Werte der übrigen Fragmente dazu in Bezug errechnet.

3.3.3 Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP und Etablierung des Re-Adhäsions-Assays

Die mittels verschiedener proteinbiochemischer und molekularbiologischer Methoden untersuchte Bindung von ADAM15 und PABP ergab, dass beide Proteine miteinander interagieren. Um die Bindung von ADAM15 und PABP auch auf zellulärer Ebene *in situ* nachzuweisen, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von ADAM15 und PABP durchgeführt.

In Vorversuchen wurde die Färbung von PABP an HeLa-Zellen etabliert. Zu diesem Zweck wurden auf Objektträger aufgewachsene HeLa-Zellen mit anti-PABP Antikörpern inkubiert und Alexa Fluor 594 konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Es zeigte sich, dass PABP in normal wachsenden, nicht synchronisierten HeLa-Zellen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung aufwies (Abbildung 33A). Jedoch konnte in ungefähr 5 % der HeLa-Zellen eine Positivfärbung an der Zelloberfläche in einem punkt- oder strichförmigem Muster festgestellt werden (Abbildung 33B-D), was darauf schließen lässt, dass PABP unter bestimmten Voraussetzungen auch an der Plasmamembran lokalisiert ist. Die PABP-Färbung in punktförmigem Muster an der Plasmamembran war bei Zellen zu beobachten, die sich möglicherweise gerade durch ein teilweises Ablösen auf die Zellteilung vorbereiteten, wie sich aus der morphologischen Veränderung der Zelle vermuten ließ (Abbildung 33B). In einigen der Zellen war eine noch ausgeprägtere Färbung von PABP als Punkte oder Striche an der Front der Plasmamembran zu detektieren (Abbildung 33C, D). Diese Zellen könnten sich möglicherweise in einer post-mitotischen Re-Adhäsionsphase befunden haben, da zwei gut definierte Zellkerne eng aneinander liegend zu beobachten waren.

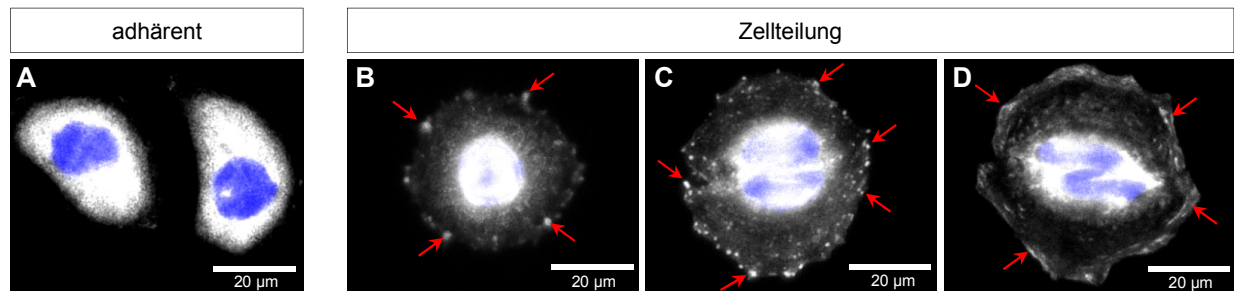


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung von PABP in HeLa-Zellen. (A-D) Die auf Objektträgern aufgewachsenen, fixierten HeLa-Zellen wurden immunfluoreszent mit anti-PABP Antikörpern und Alexa Fluor 594 gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt, die Zellkerne mit DAPI visualisiert und im Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen. Bei der Mehrheit der adhärenz HeLa-Zellen lag eine zytoplasmatische Verteilung von PABP vor (A), wohingegen bei HeLa-Zellen, die sich auf Grund ihrer abgerundeten Morphologie und den eng aneinander liegenden Zellkernen vermutlich in einem mitotischen Zellstadium befanden, PABP als punktförmige Strukturen an der Plasmamembran der Zellen detektiert wurde (B-D, rote Pfeile).

Die Beobachtung, dass PABP im Gegensatz zur diffusen zytoplasmatischen Anfärbung von normal aufgewachsenen adhärenz Zellen ebenfalls in punktförmigen Strukturen an der Plasmamembran in einzelnen abgerundeten, sich vermutlich teilenden HeLa-Zellen detektiert wurde, führte zur Etablierung eines *in vitro* Re-Adhäsions-Assays, bei dem adhärenz aufgewachsene Zellen schonend mittels EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und anschließend re-adhärenz wurden.

Primäre humane OA-Chondrozyten und die K4IM-Synovialfibroblasten-Zelllinie wurden mittels EDTA vollständig abgelöst, auf Objektträgern für 1 bis 2 h re-adhärenz, fixiert, mit anti-ADAM15 und anti-PABP Antikörpern doppelt gefärbt und mit Alexa Fluor 488 bzw. Alexa Fluor 594 gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Normal aufgewachsene, adhärenz OA-Chondrozyten wiesen eine ADAM15-Färbung an der Plasmamembran und um den Zellkern im Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER) auf (Abbildung 34A), wohingegen PABP ausschließlich eine diffuse, zytoplasmatische Verteilung auswies (Abbildung 34B, C, C'). Allerdings konnte im Vergleich dazu in den re-adhärenz, noch nicht ausgebreiteten OA-Chondrozyten sowohl eine ADAM15- (Abbildung 34D) als auch eine PABP-Färbung (Abbildung 34E) ko-lokal in großen Lamellipodien-artigen Randbereichen der Plasmamembran detektiert werden (Abbildung 34F und F'). Bei Chondrozyten, die schon weiter ausgebreitet waren, war ADAM15 deutlich in Fokalkontakt-ähnlichen Strukturen in den Zellausläufern zu detektieren (Abbildung 34G), wobei PABP noch in einigen dieser Zellausläufer nachgewiesen werden konnte, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als in den noch runden Zellen (Abbildung 34H, I, I'). Dies lässt darauf schließen, dass es während der Re-Adhäsion zu einer vermehrten Bindung von PABP an ADAM15 kommt und

sich diese mit fortschreitender Ausbreitung der Zelle wieder verringert. Analog zu den OA-Chondrozyten konnte in re-adhären, noch nicht ausgebreiteten K4IM-Synovialfibroblasten mittels der Doppelfärbung von ADAM15 und PABP ebenfalls eine Ko-Lokalisation beider Proteine in Lamellipodien-artigen Strukturen an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 34L und L').

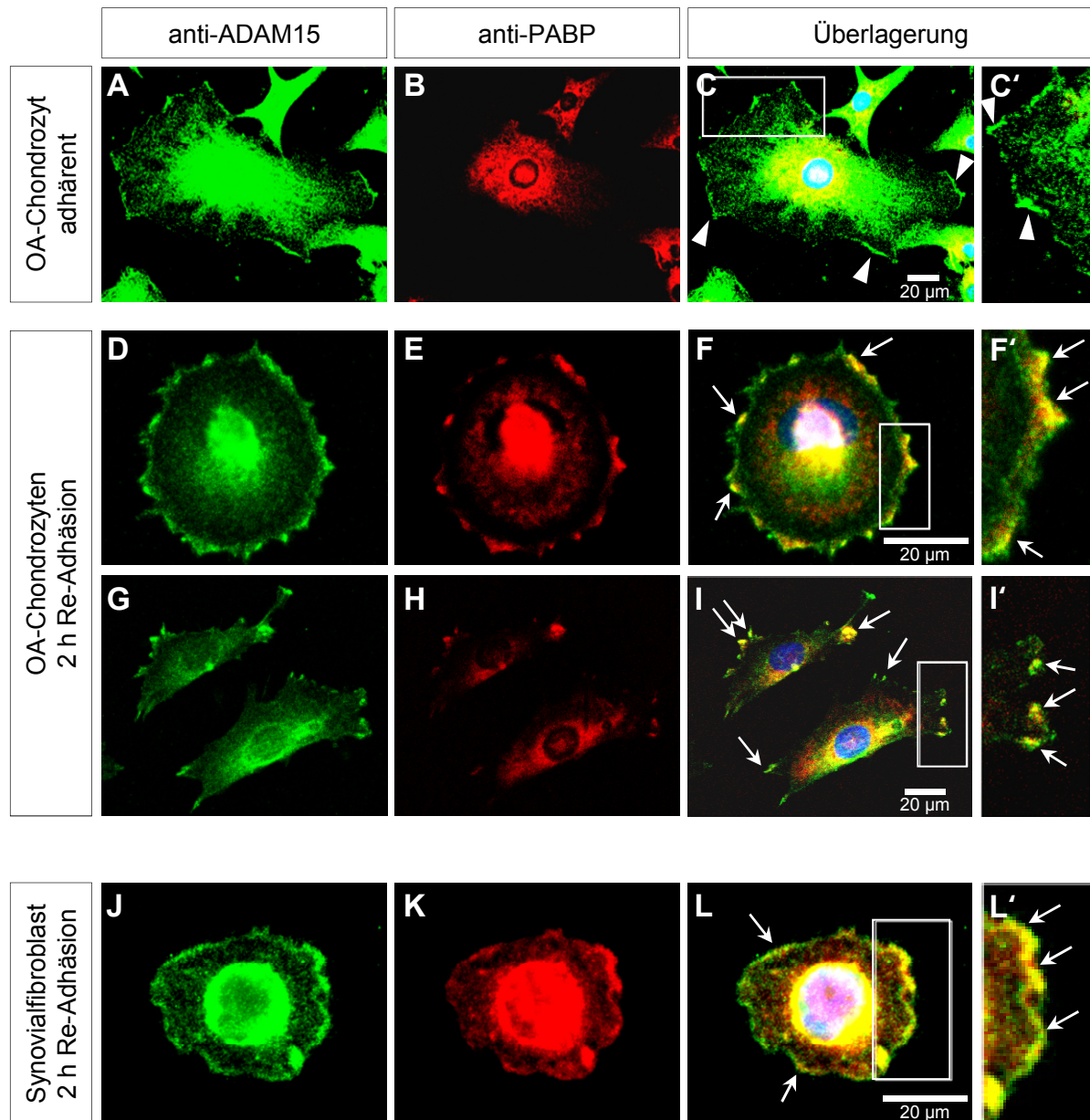


Abbildung 34: Doppelfärbung von ADAM15 und PABP in OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten nach Re-Adhäsion. (A-L) Die auf Objektträgern ausgesäten, fixierten Zellen wurden immunfluoreszent mit anti-ADAM15 und anti-PABP Antikörpern und den Alexa Fluor 488 (grün) bzw. 594 (rot) gekoppelten Sekundärantikörpern doppelt gefärbt, die Zellkerne mit DAPI visualisiert und im Konfokalmikroskop aufgenommen. In normal aufgewachsenen, adhären OA-Chondrozyten ließ sich ADAM15 an der Plasmamembran sowie um den Zellkern anfärben (A) und PABP nur im Zytoplasma der Zelle (B), wie in der Überlagerung (C) und dem vergrößerten Ausschnitt (C') deutlich wird (weiße Pfeilköpfe). Eine Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP in Lamellipodien-

artigen Bereichen der Plasmamembran kann nach der Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale und der anschließenden Re-Adhäsion für 2 h sowohl bei OA-Chondrozyten (**D-F**) als auch K4IM-Synovialfibroblasten (**J-L**) beobachtet werden. Bei noch wenig adhären, runden Zellen ist die Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP in Lamellipodien-artigen Zellfronten sehr deutlich (**F** und **L**, weiße Pfeile), wohingegen sie bei weiter adhären, ausgebreiteten Zellen nur noch in wenigen Zellausläufern zu erkennen ist (**I**, weiße Pfeile). Die Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP an der Plasmamembran nach der Re-Adhäsion ist in der Überlagerung und deren Vergrößerung (**F'**, **I'**, **L'**, weiße Pfeile) deutlich als gelbe Bereiche zu erkennen.

3.3.4 Nachweis der membranständigen Interaktion von ADAM15 und PABP

Die mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbungen nachgewiesene Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP an der Plasmamembran sollte ebenfalls mit proteinbiochemischen Methoden bestätigt werden. Dafür wurden Lysate von mit ADAM15 transfizierten T/C28a4 Chondrozyten in einem Sucrosegradienten aus 15 %, 38 % und 60 % Sucrose aufgetrennt, die Membranfraktion aus der Schicht zwischen 38 % und 60 % entnommen und die Präparation mittels Immunblot unter Verwendung von verschiedenen Antikörpern als Organell-Marker analysiert. In dieser Fraktion konnten die in der Plasmamembran verankerten Proteine ADAM15 und α_5 -Integrin detektiert werden (Abbildung 35A). Allerdings konnte auch Calnexin, welches ein spezifischer Marker für das endoplasmatischen Retikulum (ER) ist, in der Plasmamembranfraktion nachgewiesen werden, was zeigt, dass sich ER-Membranen mit dieser Methode nicht von der Plasmamembran trennen lassen. Auch zytoplasmatisches PABP und β -Tubulin wurde mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen, wohingegen das im Zellkern vorkommende Protein Myc nicht nachgewiesen wurde, was auf eine effiziente Entfernung des Zellkerns schließen lässt.

Um die Ko-Isolation von Membranen des ER auszuschließen, wurde eine andere Methode der Plasmamembranisolation etabliert, bei der Oberflächenproteine biotinyliert und mittels Streptavidin aufgereinigt werden. Dafür wurden mit ADAM15 transfizierte T/C28a4 Chondrozyten mit membranimpermeablen EZ-Link-Sulfo-NHS-LCLC-Biotin inkubiert und mit Formaldehyd kreuzvernetzt, um die temporär während der Re-Adhäsion an der Plasmamembran gebildeten Proteinkomplexe zu fixieren. Nach der Zelllyse wurden die Proteine mit Streptavidin-beschichteten Magnetkügelchen präzipitiert und die Präparation mit entsprechenden Antikörpern für die verschiedenen Organell-Marker im Immunblot analysiert. ADAM15 und α_5 -Integrin konnten als Plasmamembranproteine erneut nachgewiesen werden, wohingegen das spezifisch im ER vorkommende Calnexin bei dieser Methode nicht detektiert wurde (Abbildung 35B).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich das Verfahren der Plasmamembran-Biotinylierung zur Anreicherung der Plasmamembranproteine ohne Verunreinigung durch

das ER eignete. Tubulin wurde ebenfalls präzipitiert, was dadurch erklärt werden kann, dass nach Formaldehyd-Fixierung das Zytoskelett mit den Adhäsionskomplexen an der Plasmamembran verbunden ist, wohingegen zytoplasmatisches PABP nicht detektiert werden konnte.

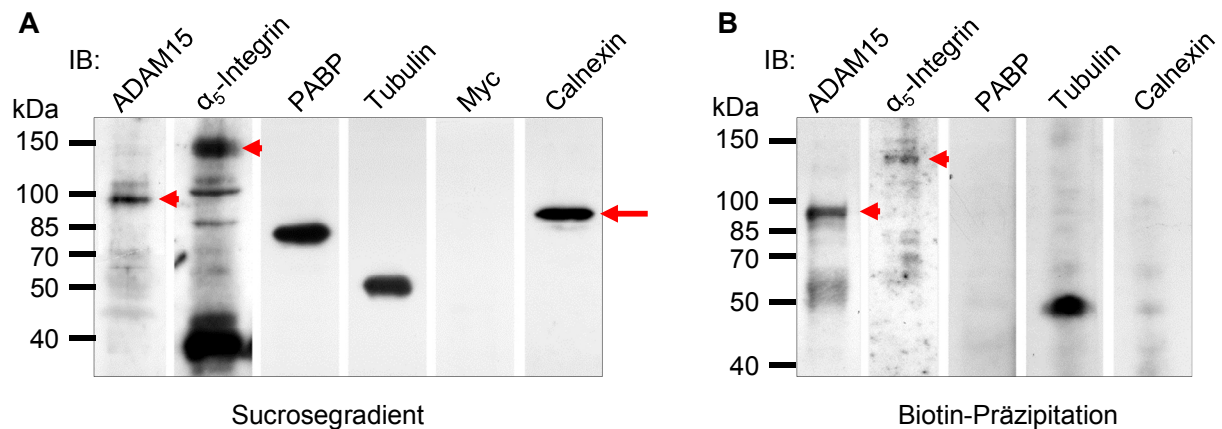


Abbildung 35: Isolation der Plasmamembran aus mit ADAM15 transfizierten T/C28a4-Chondrozyten. (A) Die Plasmamembran wurde mittels Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und die Plasmamembranfraktion mit verschiedenen Organell-spezifischen Antikörpern im Immunblot (IB) analysiert. Neben den Plasmamembranproteinen ADAM15 und α_5 -Integrin (rote Pfeilköpfe) waren auch das ER-ständige Protein Calnexin (roter Pfeil), die zytoplasmatischen Proteine PABP und Tubulin nachweisbar, während das Kernprotein Myc nicht zu detektieren war. (B) Die Plasmamembran wurde nach Oberflächen-Biotinylierung mittels Präzipitation an Streptavidin-Magnetkugeln angereichert und mit verschiedenen Organell-spezifischen Antikörpern im Immunblot (IB) analysiert. Es zeigte sich, dass auch bei dieser Methode Plasmamembranproteine wie ADAM15 und α_5 -Integrin (rote Pfeilköpfe) isoliert wurden, im Gegensatz zur Sucrosegradienten-Aufreinigung allerdings ohne Kontamination mit ER-Membranen, da Calnexin nicht nachweisbar war.

Der proteinbiochemische Nachweis der Lokalisation von PABP an der Plasmamembran nach der Induktion der Adhäsion wurde zunächst anhand zweier ADAM15-exprimierender Zelllinien (K4IM-Synovialfibroblasten und HeLa-Zellen) erbracht. Die Zellen wurden nach Ablösen mittels EDTA für 30 bis 120 min re-adhärert, die biotinylierten Plasmamembranproteine mittels Streptavidin-Magnetkugeln aufgereinigt und im Immunblot mit anti-PABP Antikörpern analysiert. Infolge der Re-Adhäsion zeigte sich ein zeitabhängig ansteigendes PABP-Signal bis 60 min sowohl bei K4IM-Synovialfibroblasten als auch bei HeLa-Zellen (Abbildung 36, oberes Panel), was klar anzeigt, dass im Verlauf der Adhäsionsprozesses vermehrt PABP an der Zelloberfläche vorliegt. Die abgewaschenen Immunblots wurden mit anti-ADAM15 Antikörpern inkubiert und zeigten eine gleichmäßige Expression von ADAM15 an der Plasmamembran (Abbildung 36, mittleres Panel). Allerdings ist nur ein geringer Teil von PABP an der Plasmamembran lokalisiert, während der

wesentliche Teil des Gesamt-PABP-Gehalts der Zelle zytoplasmatisch vorliegt (Abbildung 36, unteres Panel). Dies zeigte sich daran, dass 20 ng Gesamt-Zelllysat, was 1/10 der für die IP eingesetzten Lysatmenge entspricht, ausreichen, um eines starkes PABP-Signal im Immunoblot zu erhalten.

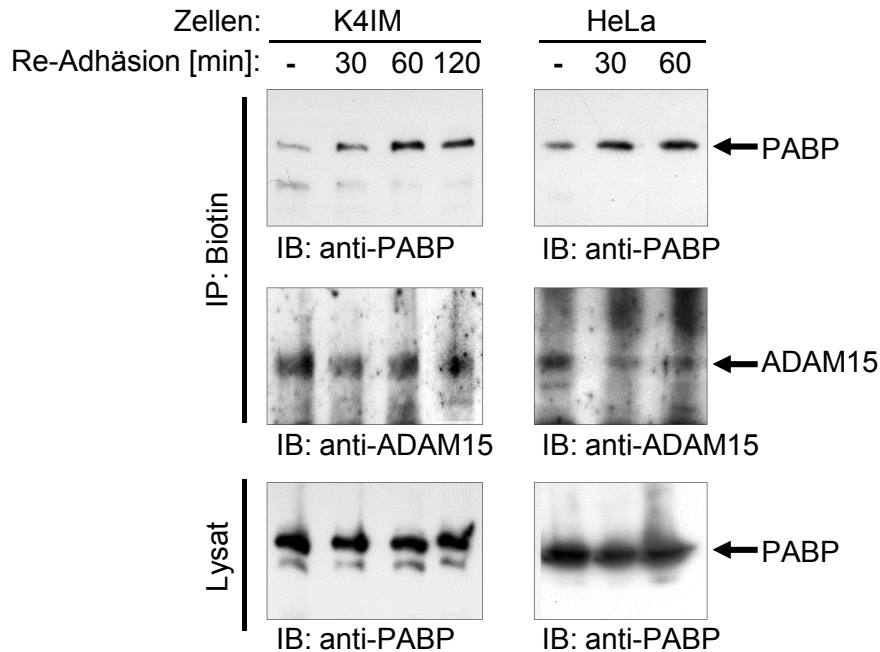


Abbildung 36: Lokalisation von PABP an der Plasmamembran nach Induktion der Re-Adhäsion. K4IM-Synovialfibroblasten oder HeLa-Zellen wurden mittels EDTA abgelöst und für 30 bis 120 min re-adhärert. Nach der entsprechenden Adhäsionszeit wurde die Zelloberfläche biotinyliert, mit Formaldehyd kreuzvernetzt und das Zelllysat mit Streptavidin-Magnetkügelchen (IP) präzipitiert. Die Anreicherung von PABP wurde mittels anti-PABP Antikörpern im Immunblot (IB) analysiert. Bei beiden Zelltypen war nach Re-Adhäsion bis 60 min eine ansteigende Menge von PABP an der Plasmamembran nachweisbar im Vergleich zu normal aufgewachsenen Zellen (-) (oberes Panel). Die Expression von ADAM15 an der Plasmamembran war in allen Lysaten gleich, wie die Inkubation des Immunblots mit anti-ADAM15 Antikörpern zeigte (mittleres Panel). Unteres Panel: Durch Auftragen von 20 µg Gesamt-Zelllysat (entspricht 1/10 der für die IP eingesetzten Lysatmenge) und Detektion von PABP mittels anti-PABP Antikörpern im Immunblot wurde kontrolliert, dass für die IP die gleichen Mengen eingesetzt wurden. Außerdem wird hierdurch deutlich, dass PABP hauptsächlich zytoplasmatisch vorliegt und nur ein geringer Anteil der Gesamt-PABP-Menge im Verlauf der Adhäsion an der Plasmamembran lokalisiert.

Um die Lokalisation von PABP an der Zelloberfläche nach Induktion der Adhäsion in Abhängigkeit von der ADAM15-Expression zu setzen, wurde die Re-Adhäsions-Versuch mit den T/C28a4 Chondrozyten, die mit komplettem ADAM15, ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne (ADAM15ΔZyto) oder Kontrollvektor transfiziert waren, durchgeführt.

Analog zu den oben beschriebenen Versuchen wurde die biotinylierte, aufgereinigte Plasmamembran von normal aufgewachsenen sowie re-adhären Zellen im Immunblot mit anti-PABP Antikörpern analysiert. Bei normal aufgewachsenen ADAM15-transfizierten Zellen konnte PABP an der Plasmamembran nachgewiesen werden, wobei die Menge an detektiertem PABP an der Plasmamembran nach der Re-Adhäsionszeit von 60 min deutlich anstieg (Abbildung 37A, oberes Panel). Bei der Vektorkontrolle hingegen war sowohl bei normal adhären als auch bei re-adhären Zellen nur ein schwaches PABP-Signal detektierbar. Auf dem abgewaschenen Immunblot wurde mittels anti-ADAM15 Antikörpern die Expression von ADAM15 an der Plasmamembran kontrolliert (Abbildung 37A, mittleres Panel). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass in Anwesenheit von ADAM15 im Verlauf der Adhäsion deutlich mehr PABP an der Plasmamembran lokalisiert.

Um zu verifizieren, dass die Lokalisation von PABP an der Zelloberfläche tatsächlich von ADAM15 abhängig ist, wurden Chondrozyten, die mit komplettem ADAM15 oder der Deletionsmutante ohne die zytoplasmatische Domäne ADAM15 Δ Zyto transfiziert waren unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen untersucht. Im Gegensatz zu den mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen ließ sich bei den mit ADAM15 Δ Zyto transfizierten Zellen kaum PABP an der Plasmamembran von normal aufgewachsenen Zellen nachweisen (Abbildung 37B, oberes Panel). Weiterhin ließ sich auch nach der Re-Adhäsion kein Anstieg von PABP an der Plasmamembran der mit der Deletionsmutante transfizierten Zellen detektieren. Zur Kontrolle der Expression von ADAM15 bzw. ADAM15 Δ Zyto an der Plasmamembran wurde der abgewaschene Immunblot mit anti-ADAM15 Antikörpern inkubiert (Abbildung 37B, mittleres Panel).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass es vermittelt durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 zu einer Lokalisation von PABP an die Plasmamembran kommt, die im Verlauf des Re-Adhäsionsprozesses verstärkt wird.

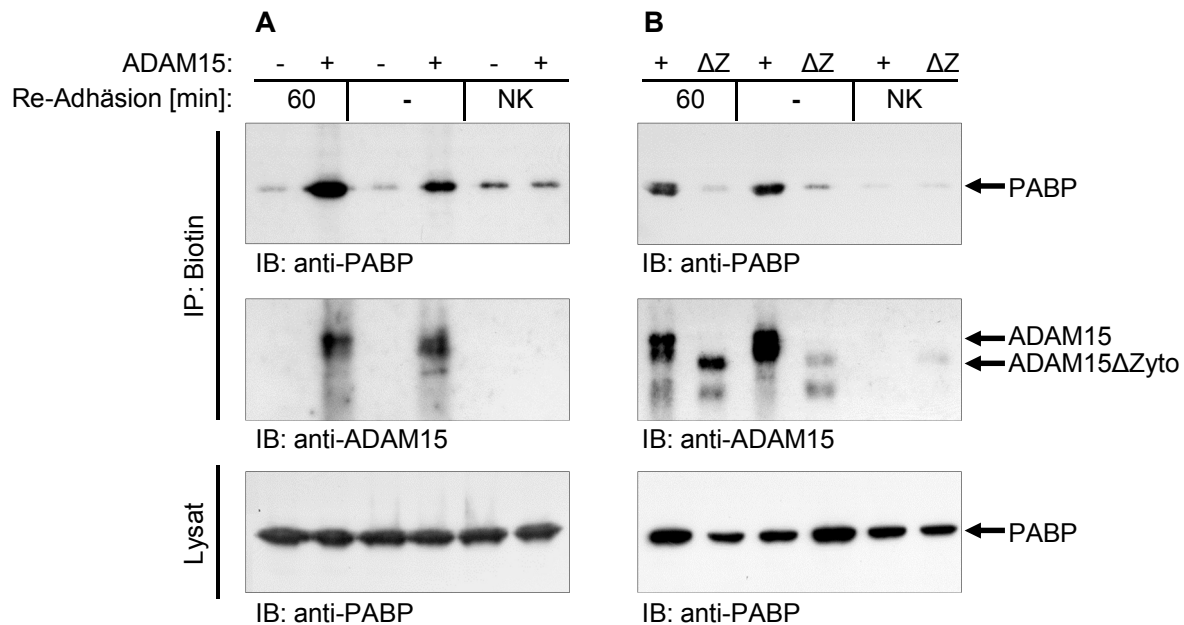


Abbildung 37: PABP-Lokalisation an der Plasmamembran in Abhängigkeit von ADAM15. (A, B) Mit Kontrollvektor (-), ADAM15 (+) oder ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne (ΔZ) transfizierte TC28a/4 Chondrozyten wurden mittels EDTA abgelöst, für 60 min adhärirt, die Zelloberfläche biotinyliert, mit Formaldehyd kreuzvernetzt und das Zelllysate nach Präzipitation an Streptavidin-Magnetkugeln (IP) mittels anti-PABP Antikörpern im Immunblot (IB) analysiert. (A) Im Vergleich zu mit Kontrollvektor transfizierten Zellen war die stärkste Lokalisation von PABP an der Plasmamembran bei den ADAM15-transfizierten Zellen zu detektieren, die wiederum nach der Re-Adhäsion von 60 min deutlich stärker als bei normal aufgewachsenen Zellen (-) war (oberes Panel). (B) Zellen, die mit ADAM15 ΔZ transfiziert waren, zeigten im Vergleich zu den mit komplettem ADAM15 transfizierten Zellen weder nach 60 min Re-Adhäsion noch ohne Re-Adhäsion eine verstärkte PABP-Anreicherung an der Plasmamembran (oberes Panel). (A und B, mittleres Panel) Die Expression von ADAM15 bzw. ADAM15 ΔZ an der Plasmamembran wurde in allen Lysaten mit anti-ADAM15 Antikörpern nachgewiesen. (A und B, unteres Panel) Die Kontrolle der gleichmäßigen PABP-Expression erfolgte durch Auftragen von 1/10 der für die IP eingesetzten Lysatmenge (20 μ g) im Immunblot mittels anti-PABP Antikörpern. Als Negativkontrolle (NK) wurde die Präzipitation an Streptavidin-Magnetkugeln ohne vorherige Biotinylierung der Zelloberfläche mitgeführt und zeigte eine geringe unspezifische Bindung von PABP an die Streptavidin-Magnetkugeln an.

3.3.5 Nachweis der Translation an der Plasmamembran als Folge der Re-Adhäsion mittels Immunfluoreszenzfärbung

Mittels eines Puromycilierungs-Assays, bei dem durch den Einbau von Puromycin anstelle eines Tyrosins die Proteintranslation terminiert wird, sollte untersucht werden, ob die Interaktion von ADAM15 und PABP an der Zelloberfläche einen Einfluss auf die Proteintranslation an der Zelloberfläche hat.

Primäre humane OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten wurden mittels EDTA vollständig abgelöst, auf Objektträgern für 2 h re-adhärert, mit Puromycin inkubiert, fixiert und zum einen mit anti-Puromycin und anti-ADAM15 Antikörpern und zum anderen mit anti-Puromycin und anti-PABP Antikörpern doppelt gefärbt und mit Alexa Fluor 488 bzw. Alexa Fluor 594 gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

In normal aufgewachsenen, adhärenen OA-Chondrozyten ließ sich das in translatierte Proteine eingebaute Puromycin diffus im Zytoplasma aber nicht an der Plasmamembran nachweisen (Abbildung 38A), wohingegen ADAM15 sowohl zytoplasmatisch als auch an der Plasmamembran vor allem in Zellausläufern detektiert wurde (Abbildung 38B). Im Vergleich dazu konnte in den re-adhärerten, noch nicht ausgebreiteten OA-Chondrozyten sowohl eine Puromycin- (Abbildung 38D) als auch eine ADAM15-Färbung (Abbildung 38E) ko-lokal als deutliche punktförmige Signale an der Plasmamembran detektiert werden (Abbildung 38F und F'), was darauf schließen lässt, dass eine evidente Proteinsynthese an der Plasmamembran ko-lokal mit ADAM15 stattfindet. Analog zu den OA-Chondrozyten konnte in re-adhärerten, noch nicht ausgebreiteten K4IM-Synovialfibroblasten ebenfalls eine eindeutige Ko-Lokalisation von Puromycin und ADAM15 in den Lamellipodien-artigen Strukturen der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abbildung 38I und I').

Die Doppelfärbungen mit anti-Puromycin und anti-PABP Antikörpern von normal aufgewachsenen OA-Chondrozyten zeigten eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung sowohl von Puromycin (Abbildung 38J) als auch PABP (Abbildung 38K), die in der Überlagerung der beiden Färbungen deutlich ist (Abbildung 38L und L'). Im Vergleich dazu ist in den re-adhärerten, noch runden Zellen die Ko-Lokalisation von Puromycin (Abbildung 38M) und PABP (Abbildung 38N) auch in den Lamellipodien-artigen Zellfronten deutlich detektierbar (Abbildung 38O und O'). Analog zu den Färbeergebnissen der OA-Chondrozyten ist bei den K4IM-Synovialfibroblasten ebenfalls die Ko-Lokalisation von Puromycin und PABP an der Plasmamembran in den re-adhärerten, runden Zellen deutlich nachweisbar (Abbildung 38R und R').

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass PABP durch den Adhäsionsprozess an der Plasmamembran lokalisiert und an der dortigen durch den Adhäsionsprozess hervorgerufenen Translation beteiligt ist.

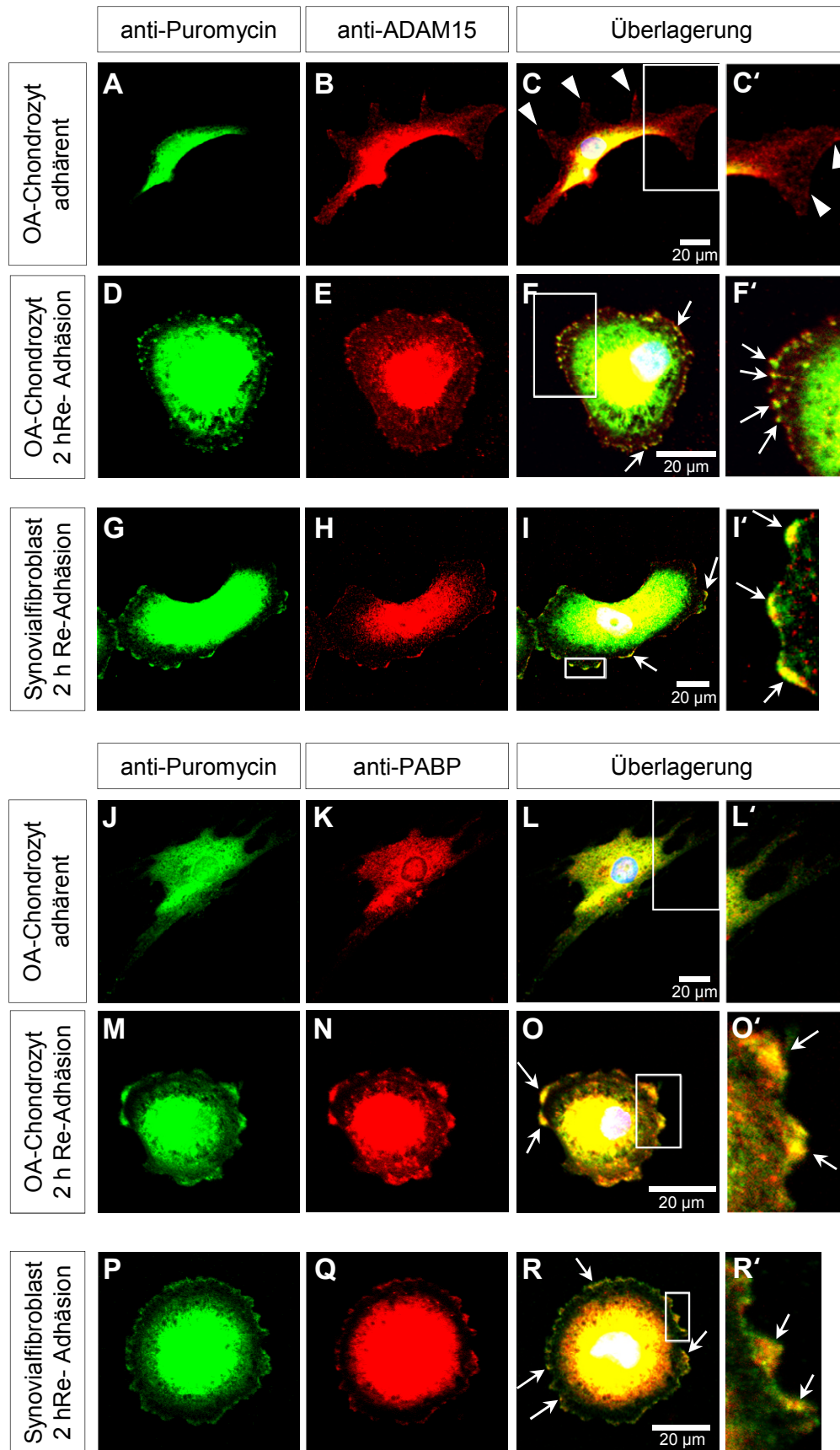


Abbildung 38: Translation an der Plasmamembran nach Re-Adhäsion. (A-R) OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten wurden nach Ablösen mittels EDTA 2 h re-adhärirt und mit Puromycin inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit anti-Puromycin und anti-ADAM15 bzw. anti-PABP

Antikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern gefärbt und mittels Konfokalmikroskop aufgenommen. In normal aufgewachsenen Chondrozyten (**A-C**) zeigt sich keine Ko-Lokalisation von Puromycin (grün) und ADAM15 (rot) an der Plasmamembran, da nur ADAM15 membranständig nachgewiesen werden kann (**C**, **C'**, weiße Pfeilköpfe). Nach 2-stündiger Re-Adhäsion ko-lokalisieren ADAM15 und Puromycin an Lamellipodien-artigen Zellfronten (**F**, **F'**, **I**, **I'**, weiße Pfeile) sowohl in OA-Chondrozyten (**D-F**) als auch K4IM-Synovialfibroblasten (**G-I**). Ebenfalls ist eine Ko-Lokalisation von Puromycin (grün) und PABP (rot) in Lamellipodien-artigen Zellausläufern der Plasmamembran nach 2 h Re-Adhäsion sowohl in OA-Chondrozyten (**M-O**) als auch K4IM-Synovialfibroblasten zu beobachten (**P-R**), während in normal aufgewachsenen, ausgebreiteten OA-Chondrozyten Puromycin und PABP eine zytoplasmatische Färbung zeigen (**J-L**). Die rechten Aufnahmen zeigen vergrößerte Ausschnitte der mit einem weißen Rechteck markierten überlagerten Bilder.

3.3.6 Translation an der Plasmamembran in Abhängigkeit von ADAM15

Die in den Immunfluoreszenz-Färbungen durch den Einbau von Puromycin visualisierte Proteinsynthese an der Plasmamembran sollte biochemisch mittels der SUnSET-Methode (*Surface Sensing of Translation* [146]) nachgewiesen und eine Abhängigkeit der Translationslokalisierung von ADAM15 gezeigt werden.

Dafür wurden mit komplettem ADAM15 oder der Deletionsmutante ohne die zytoplasmatische Domäne (ADAM15 Δ Zyto) transfizierte T/C28a4 Chondrozyten re-adhärert, während der Biotinylierung (wie unter 3.3.4 beschriebenen) zusätzlich mit Puromycin inkubiert und die mit Streptavidin aufgereinigten Präzipitate mittels Immunblot mit anti-Puromycin Antikörpern analysiert.

Bei normal aufgewachsenen, adhärenen Zellen ließen sich sowohl bei den mit dem kompletten ADAM15 als auch bei den mit ADAM15 Δ Zyto transfizierten Zellen nach der Inkubation mit Puromycin fast keine durch Puromycin-terminierten Proteine an der Plasmamembran nachweisen (Abbildung 39, oberes Panel). Nach der Re-Adhäsion der mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen war sowohl nach 45 min als auch nach 60 min deutlich mehr Puromycin-Einbau in Proteine verteilt über die gesamte Laufspur detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass während der Re-Adhäsion aktive Proteinsynthese an der Plasmamembran stattfindet. Im Gegensatz dazu waren bei den mit der Deletionsmutante ADAM15 Δ Zyto transfizierten Zellen deutlich weniger Proteine mit Puromycin-Einbau an der Plasmamembran zu detektieren. Dies bedeutet, dass nur bei den mit dem kompletten ADAM15 transfizierten Zellen im Verlauf der Adhäsion eine verstärkte allgemeine Translation an der Plasmamembran stattfindet.

Die Beladung mit Gesamtzelllysate zeigt anhand der Menge des eingebauten Puromycins, dass die Gesamt-Translationsmenge der ADAM15- und ADAM15 Δ Zyto-transfizierten Zellen gleich war. Die Kontrolle mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) zeigt, dass die

Translation sowohl an der Plasmamembran als auch im Zytoplasma inhibiert wurde. Zur Kontrolle der Expression von ADAM15 bzw. ADAM15 Δ Zyto an der Plasmamembran wurde der abgewaschene Immunblot mit anti-ADAM15 Antikörpern inkubiert (Abbildung 39, unteres Panel).

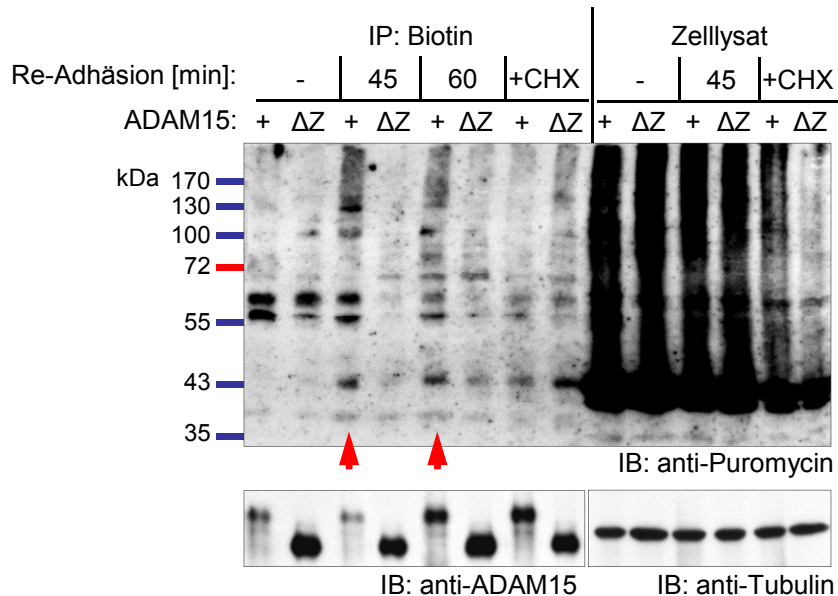


Abbildung 39: Translation an der Plasmamembran nach Re-Adhäsion in Abhängigkeit von ADAM15 in T/C28a4-Chondrozyten. Die mit dem kompletten ADAM15 (+) oder der ADAM15-Deletionsmutante ohne die zytoplasmatische Domäne (Δ Z) transfizierten T/C28a4 Chondrozyten wurden für 45-60 min re-adhärert, während der Oberflächen-Biotinylierung mit Puromycin inkubiert, kreuzvernetzt und die Zelllysate nach Präzipitation an Streptavidin-Magnetkügelchen (IP) im Immunblot (IB) mit anti-Puromycin Antikörpern detektiert. Mit dem kompletten ADAM15 transfizierte Zellen zeigen im Verlauf der Adhäsion eine deutlich höhere Translationsrate an der Plasmamembran (rote Pfeile) als Zellen, die mit der Deletionsmutante ohne die zytoplasmatische Domäne transfiziert waren (oberes Panel). Der abgewaschene, mit anti-ADAM15 Antikörpern inkubierte Immunblot zeigt, dass ADAM15 bzw. die Deletionsmutante von ADAM15 gleichermaßen präzipitiert wurden. Im Gesamtzelllysate (20 μ g, entspricht 1/10 der für die IP eingesetzten Menge) von sowohl mit ADAM15 als auch mit der Deletionsmutante transfizierten Zellen konnte eine hohe, gleichmäßige Gesamtmenge an durch Puromycin terminierten Proteinfragmenten nachgewiesen werden. Die gleichmäßige Beladung wurde mit anti-Tubulin Antikörpern kontrolliert. Die Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) inhibierte effektiv die Translation sowohl an den aufgereinigten Plasmamembranen als auch im Gesamtzelllysate.

Um zu verifizieren, dass die Lokalisation der Translation an der Zelloberfläche in Abhängigkeit von ADAM15 auch in anderen Zelltypen nachweisbar ist, wurde diese in HeLa-Zellen, in denen ADAM15 mittels ADAM15-spezifischen siRNAs herab reguliert wurde, unter identischen Versuchsbedingungen wie oben beschrieben durchgeführt. Die Herabregulation

mit den ADAM15-spezifischen siRNAs I und II ergab eine Reduktion der ADAM15-Expression von ungefähr 70 % für beide siRNAs (Abbildung 40, unteres Panel).

Bei den mit den Kontrollen behandelten Zellen (N und 0), in denen ADAM15 exprimiert wurde, war nach der Re-Adhäsion überwiegend im hohen und mittleren Molekulargewichtsbereich eine doppelt so hohe Signalstärke der durch Puromycin terminierten Proteinfragmenten an der Zelloberfläche zu detektieren als bei normal aufgewachsenen HeLa-Zellen (-) (Abbildung 40, oberes Panel). Darüber hinaus zeigten Zellen, bei denen ADAM15 mittels einer der beiden siRNAs I oder II herab reguliert war, nach 60 min Re-Adhäsion keinen Anstieg von durch Puromycin terminierten Proteinfragmenten an der Zelloberfläche im Vergleich zu den normal aufgewachsenen Zellen. Analog zu den oben beschriebenen Experimenten zeigt die Beladung mit Gesamtzelllysatz, dass die Gesamt-Translationsmenge der durch Puromycin terminierten Proteine unabhängig von der ADAM15-Herabregulation gleichmäßig war.

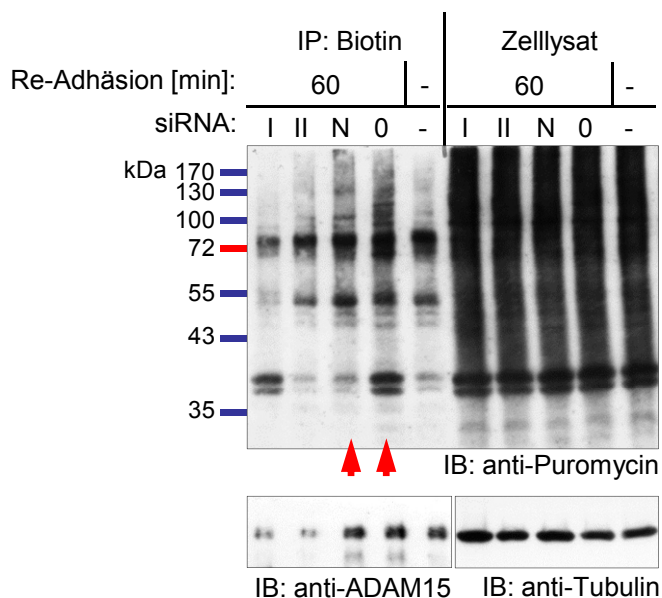


Abbildung 40: Translation an der Plasmamembran nach Re-Adhäsion in Abhängigkeit von ADAM15 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen, die mit ADAM15-spezifischer siRNA I oder II, unspezifischer siRNA (N) oder Transfektionsreagenz (0) für 40 h behandelt waren, wurden für 60 min re-adhärirt, mit Puromycin inkubiert, die biotinylierte, kreuzvernetzte Plasmamembran mit Streptavidin-Magnetkügelchen präzipitiert (IP) und die Präzipitate im Immunblot (IB) mit anti-Puromycin Antikörpern detektiert. Die re-adhärirten, mit den Kontrollen behandelten Zellen (N und 0) zeigten die höchste Translationsrate an der Plasmamembran (rote Pfeile) im Vergleich zu den ADAM15-herab regulierten, re-adhärirten Zellen (I und II) oder normal aufgewachsenen Zellen (-) (oberes Panel). ADAM15 wurde mit den spezifischen siRNAs I und II um 70 % herab reguliert (unteres Panel). Im Gesamtzelllysatz (20 µg, entspricht 1/10 der für die IP eingesetzten Menge) von sowohl ADAM15-herab regulierten als auch nicht herab regulierten Zellen konnte eine hohe, gleichmäßige Gesamt-

Translationsmenge nachgewiesen werden. Die gleichmäßige Beladung wurde mit anti-Tubulin Antikörpern kontrolliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im ADAM15-Zellkulturmodell der T/C28a4 Chondrozyten und auch in HeLa-Zellen während des Adhäsionsprozesses abhängig von ADAM15 vermehrt PABP an der Plasmamembran lokalisiert. Desweiteren ist eine an der Plasmamembran lokal verstärkte Translation abhängig von ADAM15 zu beobachten.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Protein ADAM15 in Hinblick auf die Bindung zytoplasmatischer Interaktionspartner und möglicher daraus resultierender Funktionen in osteoarthrotischen Chondrozyten untersucht.

Die Osteoarthritis ist eine entzündliche, degenerative Erkrankung des Gelenks, die mit einer Degradation des Knorpels und weiteren strukturellen Veränderungen des Gelenks einhergeht [8]. Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Gelenkknorpels besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II und Proteoglykanen, wodurch der Knorpel seine prallelastische Eigenschaft erhält [13]. Während der Osteoarthritis kommt es zu einer Verschiebung der Expression von anabolen und katabolen Faktoren, aus welcher der Verlust der Knorpelmasse resultiert. Dabei werden vermehrt Zytokine und Matrix-degradierende Proteinase sezerniert und Knorpel-untypische Kollagene gebildet, welche die Eigenschaften des gesunden Knorpels nicht wiederherstellen können [10, 17].

In osteoarthrotischen Chondrozyten wurde die erhöhte Expression von ADAM15 (*Disintegrin And Metalloproteinase 15*) [20] nachgewiesen, welches zur Proteinfamilie der ADAMs zählt, in der zahlreiche Vertreter proteolytische Eigenschaften haben [21, 39]. Außerdem wurde die vermehrte Expression anderer verwandter Matrix-degradierender Metalloproteinasen wie MMPs (Matrixmetalloproteinasen) oder Aggrekanasen (ADAMTS, *A Disintegrin And Metalloproteinases with Thrombospondin Motive*) im osteoarthrotischen Knorpel [8, 12, 148, 149] gezeigt. Auf Grund dieser Nachweise entstand die Vermutung, dass auch ADAM15 eine degenerative Wirkung auf die Knorpelmatrix und eine Funktion in der Pathogenese von entzündlichen Gelenkerkrankungen haben könnte [87]. Allerdings gibt es für die katalytische Aktivität von ADAM15, im Gegensatz zu anderen Vertretern der ADAM-Familie wie ADAM10 [150] oder ADAM17 [37], bisher nur wenige Hinweise [44, 151, 152]. Weiterhin konnte von Böhm *et al.* 2005 mittels eines ADAM15-defizienten Mausmodells die destruktive Funktion von ADAM15 im osteoarthrotischen Knorpel widerlegt werden, da ADAM15^{-/-}-Mäuse mehr Arthrose-ähnliche Veränderungen im Gelenk aufwiesen als Wildtyp-Mäuse. Dieses Ergebnis deutete vielmehr auf eine homöostatische Funktion von ADAM15 in osteoarthrotischen Chondrozyten hin [93]. In darauffolgenden Studien wurde ein chondrozytäres Zellkulturmodell entwickelt, bei dem in der chondrozytären T/C28a4-Zelllinie der ADAM15-Wildtyp oder verschiedene Deletionsmutanten von ADAM15 exprimiert wurden. Mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 einen Einfluss auf adhäsionsabhängige Signalwege in der Zelle hat [36] und ADAM15 nach der Induktion von genotoxischem Stress anti-apoptotisch wirkt [94]. Daraus entwickelte sich

die Frage welche zytoplasmatischen Proteine an ADAM15 binden und möglicherweise zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen führen.

4.1 Bindung der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15

Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) ist eine ubiquitär exprimierte non-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase und reguliert Signalwege, die neben ihrer normalen physiologischen Funktion bei der Adhäsion und der embryonalen Entwicklung eine Rolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Krebs spielen [103, 120]. Auf Grund der Interaktion mit Integrinen wird die FAK während der Integrin-vermittelten Zelladhäsion durch Autophosphorylierung aktiviert und bildet einen Komplex mit der Kinase Src [107, 108, 117]. Dieser Komplex kann durch die Phosphorylierung anderer Proteine vielfältige nachfolgende Signalwege initiieren, die eine Funktion bei der Motilität, der Proliferation und dem Überleben der Zelle haben [153, 154].

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe die Fokale Adhäsionskinase (FAK) bereits als möglicher zytoplasmatischer Interaktionspartner von ADAM15 in osteoarthrotischen Chondrozyten identifiziert [36]. Darüber hinaus schien die Expression von ADAM15 einen Einfluss auf den Phosphorylierungszustand der FAK zu haben.

Die vor dieser Arbeit zur Identifikation der FAK als Interaktionspartner von ADAM15 eingesetzte Methode der Ko-Immunpräzipitation aus chondrozytären Zelllysaten konnte eine Adapter-vermittelte Bindung der beiden Proteine aneinander noch nicht vollständig ausschließen und ließ die Frage über die bindende Domäne der FAK offen. Daher war es ein Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Studien die direkte Bindung der FAK an ADAM15 zu zeigen und die spezifische Bindedomäne der FAK zu definieren. Weiterhin sollten mittels der Induktion von genotoxischem Stress durch Camptothecin-Stimulation von Chondrozyten mögliche Änderungen des Phosphorylierungszustandes der FAK abhängig von ADAM15 analysiert werden.

4.1.1 Spezifische Bindungsdomäne der Fokalen Adhäsionskinase an ADAM15

Zur Untersuchung der direkten Bindung verschiedener Domänen der FAK an ADAM15 wurden in dieser Arbeit rekombinante Protein-Domänen der FAK und von ADAM15 bakteriell exprimiert. In den Versuchen, welche die Interaktion zwischen den rekombinanten Proteinen von ADAM15 und der FAK mittels *Dot Blot* und *Pulldown* beschreiben, konnte eine eindeutige direkte Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 und der C-terminalen Linker-Region der FAK (Aminosäuren 707-913), die zwischen der Kinase- und der FAT-Domäne liegt, nachgewiesen werden. Diese Linker-Region ist im Gegensatz zu den anderen Domänen der FAK, die hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut sind, ein

unstrukturierter Bereich [103, 115] und hat an ihren Enden jeweils SH3 (*Src homology 3*)-Bindedomänen mit mehreren PXXP-Motiven (712-721 und 869-882). An solche Prolinreichen SH3-Bindedomänen können Proteine mit SH3-Domäne binden, zu denen einige zytoplasmatische Tyrosinkinasen wie Src und Abl oder auch die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und Adapterproteine wie Grb2 zählen [155, 156, 157, 158]. Der *in vivo* Nachweis der Interaktion der FAK mit ADAM15 mittels *Mammalian Two-Hybrid*-Technik und kleineren Protein-Fragmenten zeigte jedoch, dass der Bindungsbereich der FAK an ADAM15 in der Region 730-790 zwischen den beiden SH3-Bindemotiven liegt. Diese Arbeit liefert somit den ersten Beweis für eine direkte Interaktion eines Proteins mit dem Linker-Bereich 730-790 der FAK.

Die Immunfluoreszenzfärbungen von ADAM15 und der FAK in adhärenenten Chondrozyten zeigt den eindeutigen Befund, dass ADAM15 und die FAK in Fokalkontakten ko-lokalisieren. Die Bedeutung der FAK im Fokalkontakt ist unter anderem die Regulation des Fokalkontakt-Turnovers [159] und die Weiterleitung von Überlebenssignalen [160, 161]. Fokalkontakte bestehen aus Integrinen, welche an die extrazelluläre Matrix binden, und zytoplasmatischen Proteinen, welche die Integrine mit dem Zytoskelett verbinden [162]. Ein Bestandteil des zytoplasmatischen Proteinkomplexes des Fokalkontakts ist neben der FAK auch Src. Die Ko-Lokalisation mit Src an der Zellperipherie konnte bereits für ein anderes Mitglied der ADAM-Familie (ADAM12) nachgewiesen werden [71]. ADAM12 erhöht durch die Bindung von Src an seine zytoplasmatische Domäne die Kinase-Aktivität von Src und auch für einen weiteren Vertreter der ADAM-Familie (ADAM10) ist die Bindung von non-Rezeptor Protein-Tyrosinkinasen (PTKs) bekannt, wodurch eine mögliche Funktion für die Signalweiterleitung in der Zelle besteht [63]. In Anbetracht der potentiellen Fähigkeiten der anderen ADAM-Vertreter wäre es denkbar, dass auch die Aktivierung der Kinase-Funktion der FAK durch die Bindung an ADAM15 beeinflusst werden könnte. Diese Aktivierung der FAK könnte zum anti-apoptotischen Verhalten der verstärkt ADAM15-exprimierenden osteoarthrotischen Chondrozyten beitragen.

4.1.2 Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase in Abhängigkeit von ADAM15

In den Experimenten dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung der FAK nach der Induktion von genotoxischem Stress untersucht, um nachzuweisen, ob es in den osteoarthrotischen Chondrozyten abhängig von ADAM15 zu einer veränderten Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase kommt.

In diesen Versuchen resultierte die Expression von ADAM15 in einer verstärkten Phosphorylierung der Tyrosinreste Y397, Y576/577 und Y861 der FAK nach der Stimulation

mit Camptothecin sowohl in ADAM15-transfizierten chondrozytären T/C28a4 Zellen als auch in osteoarthrotischen Chondrozyten, wohingegen die mit Kontrollvektor transfizierte Zelllinie oder ADAM15-herabregulierte primäre Chondrozyten keine Verstärkung der Phosphorylierung nach der Induktion des genotoxischen Stresses zeigten. Wie schon von anderen Autoren publiziert, erhöhen auch andere apoptotische Stimuli Integrin-unabhängig die Phosphorylierung der FAK-Tyrosinreste. So konnte gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung in FAK-transfizierten HL-60 (*human promyelocytic leukemia cell*) Zellen zur Phosphorylierung der FAK und der anschließenden Aktivierung des PI3K-Signalwegs und von Inhibitoren der Apoptose (IAP, *Inhibitor of Apoptosis Protein*) führt [163]. Weiterhin führt die konstitutive Aktivierung der FAK in epithelialen Zelllinien zur Resistenz gegenüber Apoptose durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontakts (Anoikis) [164, 165]. Auch auf hyperosmotischen Stress reagieren verschiedene Zelltypen wie epitheliale Zelllinien und Fibroblasten mit der Phosphorylierung der FAK, was das Überleben der Zellen zur Folge hat [166]. Die Ergebnisse dieser Arbeit erbringen nun den experimentellen Nachweis für einen apoptotischen Stimulus, der in Chondrozyten abhängig von der Expression von ADAM15 zur Aktivierung der FAK führt. Zur Aktivierung der FAK wird zunächst der Tyrosinrest Y397 autophosphoryliert [104, 105]. Als Folge kann die aktivierte FAK Tyrosinkinasen mit SH2 (*Src homology 2*)-Domänen der Src-Familie wie c-Src binden und phosphorylieren [167]. Diese Src-Kinasen regulieren verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Adhäsion und Apoptose. Durch aktiviertes Src kann die FAK selbst an weiteren Tyrosinresten phosphoryliert werden [116, 168]. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste Y576/577 erhöht die katalytische Aktivität der FAK [169] und es werden weitere Proteine wie beispielsweise das Adapterprotein Paxillin gebunden und phosphoryliert [170]. Dies führt zur Bindung von SH2-Domäne beinhaltenden Proteinen an Paxillin, die in die Signalweiterleitung vom Fokalkontakt involviert sind [171, 172]. Durch die Phosphorylierung des Tyrosinrests Y861 der FAK kann es zur Bindung und Aktivierung von p130Cas kommen, welches ebenfalls Proteine mit SH2-Domäne bindet [173, 174, 175]. Demzufolge resultiert die Phosphorylierung an allen in dieser Arbeit nachgewiesenen Tyrosinresten der FAK in der Bindung und Phosphorylierung von Kinasen und Adapterproteinen, welche daraufhin unterschiedliche Signalwege aktivieren. Diese Signalwege führen unter anderem zur Erhöhung der Motilität und dem Überleben der Zelle [161, 176].

Im osteoarthrotischen Knorpel könnte die Aktivierung der FAK durch ADAM15 einen anti-apoptotischen Effekt auf die Zelle haben und somit zum Erhalt der Chondrozyten im pro-apoptotischen Milieu beitragen. In dieser Umgebung führt die Produktion von ROS zu einer genotoxischen Stress-Antwort, die durch die aktivierte FAK inhibiert werden könnte (Abbildung 41A). Die Produktion der ROS wird durch Zytokine, die von osteoarthrotischen Chondrozyten und Synovialfibroblasten sezerniert werden, oder Matrix-Fragmenten, die

durch die Degradation der extrazellulären Matrix im osteoarthrotischen Gelenk entstehen, induziert [8, 18]. Die Inhibition der genotoxischen Stress-Antwort durch die aktivierte FAK könnte den bereits gezeigten anti-apoptotischen Effekt von ADAM15 in osteoarthrotischen Chondrozyten nach der Induktion von genotoxischem Stress erklären [94].

Die Aktivierung der FAK im Fokalkontakt erfolgt normalerweise durch das Binden an Integrine, die mit extrazellulärer Matrix interagieren und somit zur Adhäsions-abhängigen Signalweiterleitung in die Zelle führen. Um zu untersuchen, ob extrazelluläre Signale durch eine von außen nach innen gerichtete Weiterleitung auch direkt vermittelt durch ADAM15 zur Aktivierung der FAK führen können, wurden in einer weiteren Studie dieser Arbeit chondrozytäre Zellen, die mit dem chimären Konstrukt aus der α -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors und der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 (IL2R α /ADAM15) transfiziert waren, mit Interleukin 2 (IL-2) stimuliert und die Phosphorylierung der FAK-Tyrosinreste analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Tyrosinreste als Folge der Stimulation mit IL-2 in den IL2R α /ADAM15-transfizierten T/C28a4-Chondrozyten eine erhöhte Phosphorylierung aufwiesen, was darauf hindeutet, dass Signale, die von einem spezifischen extrazellulären Trigger stammen, vermittelt durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 in eine erhöhte FAK-Phosphorylierung umgewandelt werden können.

Diese Arbeit erbringt klare Beweise für die Signaltransduktionsfähigkeit der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 wie in den Versuchen mit den IL2R α /ADAM15-Chimären gezeigt wurde. Ein extrazellulärer Stimulus könnte über die Bindung an eine der extrazellulären Domänen von ADAM15 zur Weiterleitung eines Signals an die zytoplasmatische Domäne und zur Aktivierung der FAK führen. Ein denkbare Szenario wäre hierbei die Ligation von EZM-Komponenten an die extrazelluläre Prodomäne von ADAM15, da die Prodomäne nachweislich mit Kollagen Typ II, einem Hauptbestandteil des hyalinen Knorpels, interagiert [36] (Abbildung 41B). Dabei käme es zu einer Integrin-unabhängigen von außen nach innen gerichteten Aktivierung der FAK.

Eine weitere Hypothese stellt die Interaktion von $\alpha_5\beta_1$ -Integrin, welches in normalen und osteoarthrotischen Chondrozyten exprimiert wird [177], in *cis* oder *trans* an der Zelloberfläche mit der Disintegrin-Domäne von ADAM15 dar. Für die Disintegrin-Domäne ist bewiesen, dass sie durch ihre in der ADAM-Familie einmalige RGD-Tripeptidsequenz mit dem $\alpha_5\beta_1$ -Integrin interagieren kann [52] (Abbildung 41C). Dies könnte zu einem Integrin-*Clustering* führen [178], wodurch unabhängig vom Zell-Matrix-Kontakt Integrine die intramolekulare Autoinhibition der Kinase- durch die FERM-Domäne der FAK lösen und somit zur Autophosphorylierung und zur darauf folgenden Signalkaskade führen könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit der klare experimentelle Nachweis für die direkte molekulare Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 mit der Linker-Region von Aminosäure 740-790 der FAK erbracht wurde. Diese Interaktion führt zu einer verstärkten Phosphorylierung der FAK in chondrozytischen Zellen nach der Induktion von genotoxischem Stress oder der Applikation eines spezifischen extrazellulären Triggers. Demnach könnte die Expression von ADAM15 in osteoarthrotischen Chondrozyten zu einer Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen führen.

Die neuartige Funktion von ADAM15 als Bindungspartner der FAK konnte bereits im Verlauf dieser Arbeit durch Fried *et al.* 2012 [144] und Böhm *et al.* 2013 [90] in osteoarthrotischen Chondrozyten bzw. rheumatoiden Synovialfibroblasten mit einer anti-apoptotischen Wirkung in Verbindung gebracht werden. Caspase 3/7 Aktivitäts-Assays zeigten in diesen Arbeiten, dass die Inhibition der FAK Signalwege und die gleichzeitige Unterdrückung der ADAM15-Expression zu einer stärkeren Aktivierung der Caspase führen und somit zu einer stärkeren Apoptoserate der Zellen. Der Befund der anti-apoptotischen Wirkung könnte jedoch auch über die homöostatische Rolle in der Knorpel-Degeneration und der Apoptose-Resistenz aggressiver pro-inflammatorischer Synovialfibroblasten hinaus Relevanz für andere pathologische Befunde wie neoplastische Krankheiten haben.

Die Überexpression von ADAM15 könnte zu einem Matrix-unabhängigen anti-apoptotischen Phänotyp führen und die Zelle somit resistent gegen Anoikis werden lassen. Die Anoikis-Resistenz ist eine Voraussetzung für die Metastasierungsfähigkeit der Zelle [179] und die Aktivierung der FAK steht in direktem Zusammenhang mit der Anoikis-Resistenz der Zelle. So führt die Herabregulation von FAK zu verstärkter Anoikis [180] und durch die Inhibition des durch Phosphorylierung aktivierten FAK-Src-Signalwegs verringern sich sowohl die Zellviabilität und Migration, als auch die Tumor-Angiogenese und das Tumorwachstum [181]. Auch die Expression von ADAM15 steht in Zusammenhang mit der Entstehung aggressiver Krebsformen. In Prostata- und Brustkrebs ist die ADAM15-Expression stark erhöht und zeigt in den Metastasen dieser Krebsarten einen weiteren Anstieg [60]. Eine durch ADAM15 hervorgerufene Aktivierung des FAK-Src-Komplexes könnte daher eine mögliche Bedeutung bei der Entstehung von malignen Tumoren haben.

Es gibt bisher keine molekulare Struktur für die gezielte ADAM15-Modulation oder -Herunterregulation [39], dennoch einige Ansätze zur generellen Expressionsunterdrückung von ADAM15 [182, 183]. In Anbetracht der Daten dieser Arbeit könnte jedoch auch die Modulation des von ADAM15 ausgehenden Signalwegs ein sinnvolles Ziel für die Behandlung pathophysiologischer neoplastischer Vorgänge sein, wie beispielsweise durch die spezifische Inhibition der Autophosphorylierung der FAK.

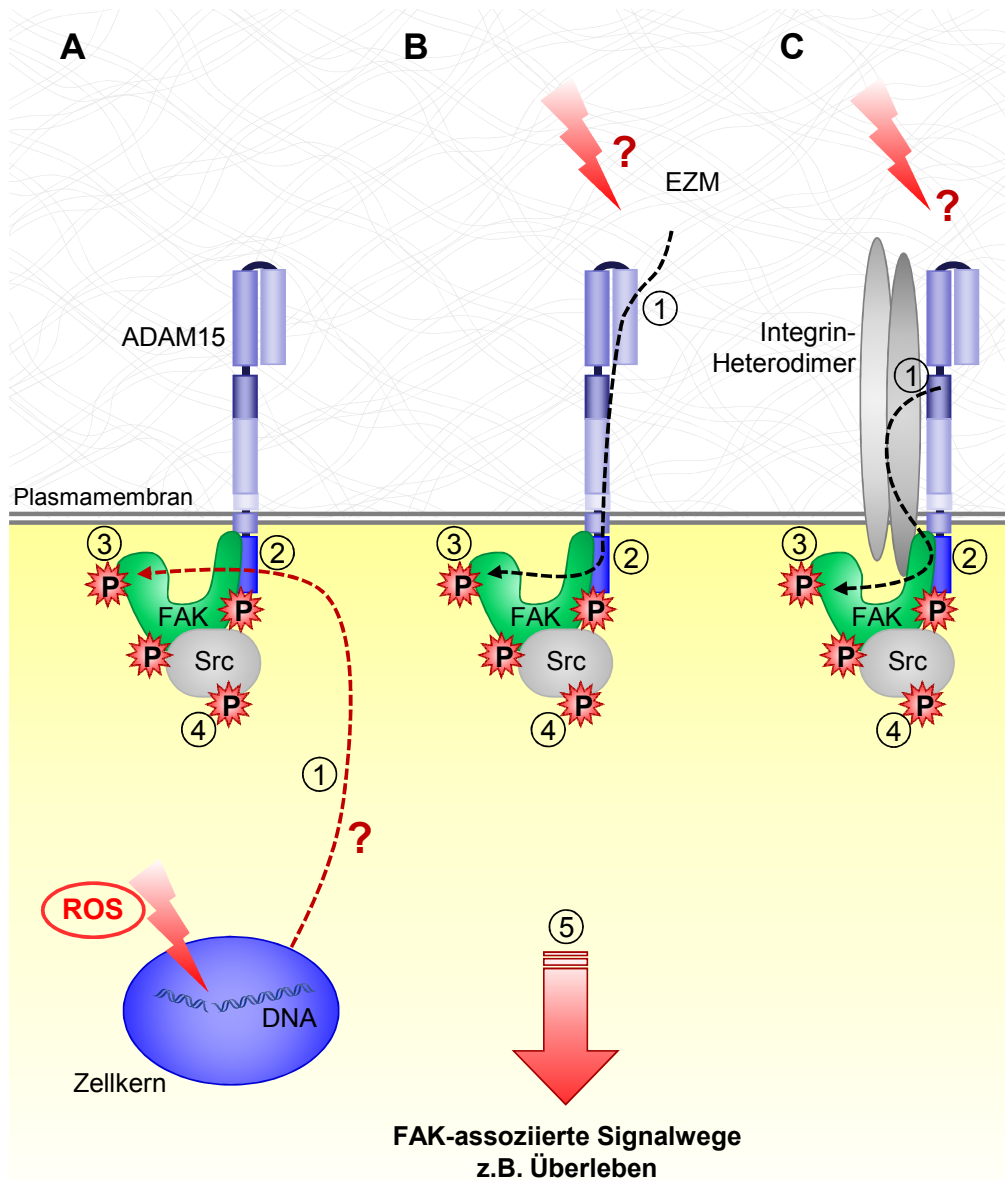


Abbildung 41: Hypothesen zur Interaktion zwischen der Fokalen Adhäsionskinase und ADAM15. (A) Reaktion auf eine komplexe genotoxische Stressantwort: Ein Signalgerüst (1) als Folge von genotoxischem Stress wie ROS (*reactive oxygen species*) im osteoarthrotischen Knorpel führt bei der Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 mit der FAK (2) zur Phosphorylierung der FAK (3), die wiederum zur Phosphorylierung von Src führt (4). (B) Ein extrazelluläres Signal durch EZM-Komponenten als Trigger: Durch die Ligation von EZM-Komponenten an die Pro-Domäne von ADAM15 (1) wird ein Signal durch die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 an die FAK transduziert (2) und führt zur Phosphorylierung der FAK (3) und Src (4). (C) Ein extrazelluläres Signal durch die Interaktion mit Integrin: Die Interaktion von Integrinen mit der Disintegrin-Domäne von ADAM15 führt zur Heterodimerisierung von α - und β -Integrin (1). Dadurch kommt es während der Interaktion der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 mit der FAK (2) zur Bindung der FERM-Domäne an Integrin, was die Autophosphorylierung der FAK ermöglicht (3) und die Phosphorylierung der FAK und Src bedingt (4). A-C: Der aktivierte FAK-Src-Komplex kann zur Aktivierung von anti-apoptischen Signalwegen führen (5).

4.2 Bindung des *Poly(A)-Binding Proteins (PABP)* an ADAM15

Aus den vorangegangenen Studien dieser Arbeit und anderen Publikationen ist bekannt, dass ADAM15 und andere Mitglieder der ADAM-Familie Bindungspartner an ihrer zytoplasmatischen Domäne aufweisen, welche zur Aktivierung von Signalwegen und dadurch zur Änderungen des zellulären Verhaltens, wie Migration und Überleben, führen können [56, 65, 66, 67]. Die Untersuchung von zytoplasmatischen Interaktionspartner in Zellen, die erhöht ADAM15 exprimieren, kann somit einen Beitrag zur Aufklärung der Prozesse leisten, die zur Pathogenese führen. Die Rolle des in osteoarthrotischen Chondrozyten nachweislich erhöht exprimierten ADAM15 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Über die in dieser Arbeit beschriebene Interaktion mit der FAK hinaus könnte es weitere, noch nicht beschriebene Bindungspartner an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 geben, deren Funktion in der Pathogenese der Osteoarthritis oder möglichen anderen Krankheiten es aufzuklären gilt.

Auf der Grundlage der potentiellen Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 für intrazelluläre Prozesse wurden mittels Massenspektrometrie weitere Interaktionspartner dieser Domäne gesucht und dadurch das *Poly(A)-Binding Protein (PABP)* identifiziert.

PABP ist ein ubiquitär exprimiertes und an der Translation beteiligtes Protein, dessen Eigenschaft die Bindung von Poly(A) der mRNA mittels seiner RRM-Domänen (*RNA recognition motives*) und die gleichzeitige Bindung von Translationsinitiationsfaktoren ist [184]. Dieser Bindungskomplex führt zur sogenannten *closed loop* Konformation der mRNA, in der sie mit hoher Effizienz translatiert werden kann und vor RNA-degradierenden Proteinen geschützt ist [185]. Die mRNA wird mit PABP zusammen aus dem Zellkern exportiert [186] und als Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) mit anderen Proteinen zu ihrem Zielort transportiert [142, 187].

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die spezifische Bindedomäne von PABP an ADAM15 zu definieren. Die in diesen Studien erstmals bewiesene Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen PABP und dem Plasmamembran-ständigen ADAM15 ließ das Interesse an der Aufklärung der Funktion dieser Interaktion aufkommen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von ADAM15 auf die Lokalisation des mRNA-bindenden PABP und der Translation mit *in vitro* Experimenten analysiert.

4.2.1 Spezifische Bindungsdomäne von PABP an ADAM15

In dieser Arbeit wurde erstmals PABP als Bestandteil des zytoplasmatischen Interaktoms von ADAM15 in chondrozytären Zellen mittels Massenspektrometrie identifiziert und in Bindungsstudien mittels Ko-Immunpräzipitation aus Lysaten von ADAM15-transfizierten

Zellen die Bindung von PABP an ADAM15 verifiziert. Auf Grund der hohen Assoziation von PABP mit mRNA war eine spezifisch oder unspezifisch durch mRNA vermittelte Bindung von PABP an ADAM15 nicht ausschließbar. Die RNA-unabhängige Interaktion konnte jedoch durch die Zugabe von RNase während der Immunpräzipitation gezeigt und demzufolge die Beteiligung der mRNA als Adapter zwischen PABP und ADAM15 ausgeschlossen werden. Die Spezifität der Präzipitation konnte durch die Verwendung einer Deletionsmutante von ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne verifiziert werden, denn wie die Versuche aus Chondrozyten, die mit ADAM15 ohne die zytoplasmatische Domäne transfiziert waren und aus denen keine Ko-Präzipitation möglich war, verdeutlichten, ist eine Bindung von PABP an ADAM15 eindeutig von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 abhängig. Die Ko-Präzipitation von PABP mit dem ADAM15-Wildtyp verifizierte somit den direkten Zusammenhang zwischen ADAM15 und PABP.

Trotz der bereits gezeigten mRNA-unabhängigen und von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 abhängigen Bindung von PABP an ADAM15, war eine durch andere Proteine des Zelllysats vermittelte Bindung noch nicht ausschließbar und die eigentliche bindende Domäne von PABP unbekannt. Die direkte Bindung von PABP an ADAM15 wurde deshalb in Studien mittels rekombinanter Proteine im ELISA-Verfahren und mittels der *Mammalian-Two-Hybrid*-Methode demonstriert. Darüber hinaus konnte hierbei die spezifische Bindedomäne von PABP an ADAM15 eruiert werden, da in zahlreichen Studien gezeigt wurde, dass PABP mehrere Möglichkeiten zur Bindung von Liganden aufweist [184]. Sowohl in den ELISA-Versuchen als auch in den *Mammalian-Two-Hybrid*-Versuchen wurde die Prolin-reiche Linker-Region von PABP als Bindungsdomäne identifiziert. Die komplette Linker-Region von Aminosäure 392-553 wies in allen Versuchen eine konstant starke Bindung an ADAM15 auf, während die Bindung des C-terminal verkürzten Bereichs 392-470, der essentiell für die Bindung von PABP an ADAM15 war, in beiden Versuchsreihen eine hohe Varianz zeigte, was auf eine mögliche Störung der Proteinkonformation durch die C-terminale Deletion und daraus folgend eine gestörte Interaktion hindeuten könnte. Die direkte Bindung der Linker-Region von PABP, die mindestens den Aminosäurenbereich 392-470 umfasst, an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 wurde somit nachgewiesen.

Da PABP selbst keine katalytischen Eigenschaften besitzt, sondern auf Grund seiner Vielzahl an möglichen Bindungspartner vielmehr ein Adapterprotein ist, sind mögliche Auswirkungen der Interaktion zwischen ADAM15 und der Linker-Region vorerst spekulativ. Für die RRM- und PABC-Domänen von PABP sind zahlreiche Liganden beschrieben, die überwiegend aus an der Translation beteiligten Proteinen und Poly(A)-mRNA bestehen, wohingegen für die Prolin-reiche Linker-Region bisher nur eine Funktion bei der Homodimerisierung von PABP beschrieben wurde [126]. Dabei konnte anhand von rekombinanten Proteinen und *in vitro* synthetisierter RNA mittels *Electrophoretic Mobility*

Shift Assay (EMSA) und *Nanopore Force Spectroscopy* gezeigt werden, dass die Linker-Region von PABP ein kooperatives Bindeverhalten an Poly(A)-mRNA vermittelt, bei dem ungefähr 50 % der PABP-Moleküle kooperativ an die Poly(A)-mRNA binden [127]. Die Linker-Region der verbleibenden Hälfte der PABP-Moleküle, die unkooperativ an die mRNA gebunden sind, ist frei für die Bindung anderer möglicher Bindungspartner. Somit besteht die Möglichkeit, dass ADAM15 an die Prolin-reiche Linker-Region von PABP bindet während dieses gleichzeitig an mRNA gebunden ist und seine Funktion bei der Translationsinitiation ausübt. Demzufolge ist eine ADAM15-abhängige lokale Translation an der Plasmamembran denkbar.

4.2.2 Proteinsynthese an der Plasmamembran in adhärierenden Zellen als Folge der Bindung von PABP an ADAM15

Die direkte Bindung von PABP an ADAM15, die in den Versuchen dieser Arbeit sowohl mit bakteriell exprimierten Proteinen mittels ELISA als auch in lebenden humanen Zellen mittels *Mammalian Two-Hybrid*-Methode demonstriert wurde, lässt eine Ko-Lokalisation von PABP mit ADAM15 an der Plasmamembran vermuten, da ADAM15 in der Plasmamembran verankert ist. Bereits in den vorherigen Versuche dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Fokalen Adhäsionskinase wurde ADAM15 an der Plasmamembran nachgewiesen und von Lum *et al.* 1998 wurde die Lokalisation von murinem ADAM15 ebenfalls an der Plasmamembran beschrieben [33]. Im Gegensatz dazu war PABP in den Immunfluoreszenzfärbungen adhärenter HeLa-Zellen hauptsächlich zytoplasmatisch und in der Nähe des ER zu detektieren. Es ließ sich jedoch in ungefähr 5 % der Zellen, die sich möglicherweise in Phasen der Zellteilung befanden, eine deutliche Plasmamembran-ständige PABP-Lokalisation nachweisen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es nur unter spezifischen zellulären Bedingungen zu einer Ko-Lokalisation und folglich zur Interaktion von ADAM15 und PABP kommt. Die Annahme, dass sich die beobachteten Zellen möglicherweise in der Zellteilung befanden, wurde auf Grund der runden Morphologie der Zellen und des engen Beieinanderliegens der Zellkerne erstellt.

Da die Zellteilung von adhären Zellen bedeutet, dass sie sich partiell ablösen, ausbreiten und re-adhären [188], wurde ein Re-Adhäsions-Modell entwickelt, welches diesen Prozess bei allen Zellen gleichzeitig initiiert. Dafür wurden die Zellen in den Experimenten chemisch oder mechanisch abgelöst und für bis zu 2 h re-adhärert. Um die temporäre Interaktion zwischen den Proteinen während des Adhäsionsvorgangs für die Durchführung von Analysen im Western Blot zu konservieren, wurden die Proteinkomplexe mittels Formaldehyd kreuzvernetzt, wodurch eine stabile chemische Bindung zwischen nahe gelegenen Proteinen entsteht. Um nur Proteinkomplexe zu isolieren, die mit Plasmamembran-ständigen Proteinen wie ADAM15 assoziiert sind, wurden die an der

Zelloberfläche liegenden Proteine biotinyliert und mittels Streptavidin-Präzipitation aufgereinigt.

Die im experimentellen Modell re-adhätierenden osteoarthrotischen Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten wiesen in Immunfluoreszenzfärbungen tatsächlich eine Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP an der Plasmamembran auf, wohingegen normal aufgewachsene Zellen keine Ko-Lokalisation zeigten. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass es während der Re-Adhäsion der Zellen zur Ko-Lokalisation von ADAM15 und PABP kommt. Die Zellen bildeten während der Re-Adhäsion Lamellipodien-artige Membran-Bereiche aus, in denen beide Proteine ko-lokal detektiert wurden. Dies beweist, dass PABP und ADAM15 in einem Bereich an der Plasmamembran während der Re-Adhäsion in räumlicher Nähe zueinander nachweisbar sind.

Mittels Western Blot konnte in den ADAM15-exprimierenden Zelllinien K4IM und HeLa konnte die Funktionalität des Re-Adhäsionsmodells und die Lokalisation von PABP an der Plasmamembran verifiziert werden. Hierbei stieg nach dem Re-Adhätieren die Menge von PABP in der Plasmamembranfraktion in positiver Korrelation zur Re-Adhäsionszeit bis zu 2 h an und war bei vollständig adhären Zellen nur schwach nachzuweisen. Dies bestätigt, dass die Lokalisation von PABP an der Plasmamembran und somit in potentieller Bindungsnähe zu ADAM15 vom Ausbreitungs- bzw. Adhäsionszustand der Zelle abhängig ist.

Die Lokalisation von PABP wurde neben weiteren an der Translation beteiligten Proteinen schon mehrfach an der Zelloberfläche von sich ausbreitenden oder migrierenden Fibroblasten beobachtet [189, 190, 191]. Der Transport von PABP an die Plasmamembran erfolgt dabei über die Bindung an das Adapterprotein Paxillin, welches ein typisches mit Fokalkontakten assoziiertes Protein ist [191, 192]. Da auch ADAM15 wie in dieser Arbeit nachgewiesen in Fokalkontakten lokalisiert ist, ist ein Zusammenhang zwischen ADAM15 und PABP an der Plasmamembran denkbar.

In den weiteren Experimenten dieser Arbeit konnte mittels des Re-Adhäsionsmodells nachgewiesen werden, dass die Lokalisation von PABP an der Plasmamembran auch in Chondrozyten während der Re-Adhäsion im Western Blot nachweisbar ist. Diese Lokalisation ist abhängig von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15, denn bei der chondrozytären T/C28a4 Zelllinie war im Western Blot bei ADAM15-Wildtyp-transfizierten Zellen eine PABP-Lokalisation an der Plasmamembran detektierbar, wohingegen diese bei Zellen, die mit Kontrollvektor oder der Deletionsmutante ohne die zytoplasmatische Domäne transfiziert waren, nicht nachweisbar war. Somit lassen diese Daten den Schluss zu, dass die Lokalisation von PABP in Plasmamembran-Nähe, die während der Re-Adhäsion entsteht, von ADAM15 abhängig ist. Da erstens ADAM15 in den Fraktionen der

Plasmamembran ebenfalls nachweisbar war, zweitens die direkte Bindung von PABP an ADAM15 in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde und drittens beide Proteine in den Immunfluoreszenzfärbungen ko-lokalisieren, ist eine direkte Bindung von PABP an ADAM15 an der Plasmamembran während der Re-Adhäsion wahrscheinlich.

Die Lokalisation von PABP an der Plasmamembran steht wie in mehreren Studien gezeigt wurde im Zusammenhang mit der Fähigkeit der Zelle sich nach dem Ablösen von der extrazellulären Matrix wieder ausbreiten und adhären zu können. So konnte von Woods *et al.* 2005 gezeigt werden, dass das rasche Ausbreiten der Zelle nach dem Ablösen nur möglich ist, wenn PABP an die Plasmamembran transportiert wird [192]. Wurde der Transport von PABP durch das Verhindern der Bindung zwischen PABP und Paxillin inhibiert, breiteten sich die Zellen asymmetrisch und um 40 % langsamer aus. Damit eine Zelle sich ausbreiten und adhären kann, bildet sie *Spreading Initiation Centers* (SICs) an der Zelloberfläche, die während des Adhäsionsprozesses zu Fokalkontakten reifen [193]. Diese SICs haben im Gegensatz zu der klar definierten, länglichen Form der Fokalkontakte eine rundliche Form, die ähnlich auch in den PABP-Immunfluoreszenzfärbungen der re-adhären Zellen dieser Arbeit beobachtet wurde. SICs enthalten neben fokalen Adhäsionsproteinen wie Vinculin und Paxillin auch RNA-bindende Proteine, wie hnRNP K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) und Sm B (*small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B*), und ribosomale RNA, woraus gefolgert werden kann, dass die Translation in den SICs an der Plasmamembran möglich ist und für den Prozess des Ausbreitens eine Rolle spielt [193]. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass es zu einem verringerten Ausbreiten der Zellen kommt, wenn die Translation während des Re-Adhärens der Zellen durch Cycloheximid inhibiert wird [194, 195]. Außerdem wurde bereits die aktive Translation an der Plasmamembran von migrierenden und differenzierenden Zellen *in vitro* nachgewiesen [141, 196].

Da PABP als mRNA-bindendes Protein eine potentielle Bedeutung für die Translation hat und in anderen Arbeiten bereits ko-lokal mit anderen Translationsfaktoren an der Plasmamembran sich ausbreitender muriner Fibroblasten (NIH3T3) und invasiver MDCK-Zellen nachgewiesen wurde [190, 197], wurde die Frage analysiert ob die Expression von ADAM15 einen Einfluss auf die Translation an der Plasmamembran der sich ausbreitenden Chondrozyten hat. Zum Nachweis der aktiven Translation wurde Puromycin vor den Immunfluoreszenzfärbungen oder Western Blots zu den Zellen gegeben und anschließend mittels anti-Puromycin-Antikörpern nachgewiesen. Puromycin ist ein Translationsinhibitor, welcher der Tyrosyl-tRNA ähnelt. Dadurch kann Puromycin an die Eingangsstelle des Ribosoms binden und auf seinen Pseudoaminosäurearm die wachsende Polypeptidkette übertragen bekommen [198]. Dies führt zu einer verfrühten Termination der Translation, was

über längere Zeit zur Apoptose der Zelle führt, kurzzeitig jedoch zum Translationsnachweis genutzt werden kann [141, 146].

In den Immunfluoreszenzfärbungen re-adhätierender OA-Chondrozyten und K4IM-Synovialfibroblasten wurde eine Ko-Lokalisation der aktiven Translation sowohl mit ADAM15 als auch mit PABP an der Plasmamembran durch die Detektion von Puromycin nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde durch den Translationsnachweis in der aufgereinigten Plasmamembranfraktion von chondrozytären Zellen und HeLa-Zellen mittels Western Blot bestätigt und ergänzt. Die Lokalisation der Translation an der Zelloberfläche während der Adhäsion ist dabei abhängig von der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15, wie der Vergleich der aktiven Translation in der Plasmamembranfraktion von Chondrozyten, die mit dem ADAM15-Wildtyp transfiziert waren, und Chondrozyten, die mit der Δ Zyto-Deletionsmutante transfiziert waren, zeigte. Auch die Versuche dieser Arbeit, bei denen ADAM15 in HeLa-Zellen mittels siRNA herabreguliert wurde, unterstützen die Aussage, dass die Lokalisation der Translation an der Zelloberfläche von ADAM15 abhängig ist, da auch hier die Translation an der Plasmamembran nach dem Herabregulieren von ADAM15 deutlich verringert war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PABP an der Plasmamembran re-adhätierender Zellen abhängig von ADAM15 lokalisiert ist und es ebenso abhängig von ADAM15 zur vermehrten Translation an der Plasmamembran in den re-adhätierenden Zellen kommt. Diese vermehrte Translation könnte darauf zurückzuführen sein, dass PABP durch die Bindung an ADAM15 an der Plasmamembran angereichert und verankert wird und somit zur lokalen Translation beitragen kann.

Die Translation in einem subzellulären Bereich ist für die Zelle energetisch günstig, da sie somit aus einer einzelnen transportierten mRNA mehrere Kopien eines Proteins lokal exprimieren kann [199]. Dies erlaubt der Zelle rasch auf lokale Anforderungen zu reagieren und vermeidet gleichzeitig die Expression in anderen Kompartimenten [200]. Die mRNA kann durch verschiedene potentielle Mechanismen an der Plasmamembran angereichert werden, die den aktiven Transport entlang des Zytoskeletts und den Schutz vor Deadenyasen an der Plasmamembran beinhalten [201]. Eine vorstellbare Funktion der Bindung von PABP an ADAM15 wäre die lokale Anreicherung von PABP an der Plasmamembran, welches an Poly(A) der mRNA gebunden ist. Die Bindung von PABP an Poly(A) führt zur Translationsinitiation und zum Schutz vor Deadenyasen (Abbildung 42). Es ist denkbar, dass die lokal translatierten Proteine zum Ausbreiten und Adhätieren der Zelle beitragen, da schon in anderen Studien mehrere mRNAs, die an der Motilität und Adhäsion beteiligte Proteine kodieren (z.B. β -Aktin, E-Cadherin, Actin-related protein 2 (Arp2)), in der Zellperipherie nachgewiesen wurden [202, 203]. Die Adhäsion auf extrazellulärer Matrix ist

für adhärenzte Zellen ein entscheidender Überlebensfaktor und auch für Chondrozyten konnte bereits gezeigt werden, dass sie durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontakts apoptotisch werden [94, 204]. Somit könnte ADAM15 auch in seiner Funktion als PABP-bindendes Protein, wie auch schon im Zusammenhang mit der FAK gezeigt wurde [144], einen homöostatischen Effekt im osteoarthrotischen Knorpel haben. Auch ein Zusammenhang zwischen der hohen Expression von ADAM15 in den Zellen aggressiver Krebsformen und seiner neu entdeckten Funktion als Translations-lokalisierendes Protein ist denkbar, da die lokale Translation und die dabei gebildeten Pseudopodien eine Voraussetzung für die Entstehung von Metastasen sind [205, 206]. Wundheilungsassays und Invasionsassays auf Matrigel zeigten, dass die Herabregulation von ADAM15 sowohl in RA-Synovialfibroblasten als auch in Krebszellen von Blasen- und Lungenkrebs zu einer verminderten Migration und Invasion führt [207, 208, 209]. Allerdings gibt es dabei auch Hinweise darauf, dass die Metalloproteinase-Domäne von ADAM15 eine katalytische Rolle bei der Reifung von migrationsfördernden Proteinen wie MMP9 spielt und weniger die zytoplasmatische Domäne durch intrazelluläre Interaktionen die Migration beeinflusst [206]. Andererseits wird nicht nur die Aktivierung sondern auch die Expression von MMPs und Cytokinen wie VEGF-A als Folge der Herabregulation von ADAM15 reduziert und dadurch die Migration und Invasion reduziert, was eher auf intrazelluläre Interaktionen mit möglicher Beteiligung der zytoplasmatischen Domäne von ADAM15 schließen lässt [205].

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit der eindeutige experimentelle Nachweis von der Bindung der Linker-Region von PABP an die zytoplasmatische Domäne von ADAM15 erbracht. Während der Verankerung von PABP an der Plasmamembran durch die Interaktion mit ADAM15 kommt es zur Translation in Lamellipodien-artigen Plasmamembran-Bereichen der adhätierenden und sich ausbreitenden Zellen. Dies wurde sowohl in osteoarthrotischen Chondrozyten und einer ADAM15-transfizierten chondrozytären Zelllinie (T/C28a4) als auch in einer Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa) demonstriert. Die durch ADAM15 hervorgerufene Lokalisation von PABP an der Plasmamembran könnte zur lokalen Translation bestimmter mRNAs führen und somit das Adhäsionsverhalten der Zelle in der extrazellulären Matrix des osteoarthrotischen Knorpels oder auch das Migrationsverhalten metastatischer Zellen beeinflussen.

Für zukünftige Versuche bleibt zu klären, ob die Bindung von PABP an ADAM15 und die daraus resultierende lokale Translation zum Überleben der Zelle im osteoarthrotischen Milieu beiträgt und für die Adhäsion und Metastasierungsfähigkeit von ADAM15-exprimierenden Krebszellen eine relevante Rolle spielt.

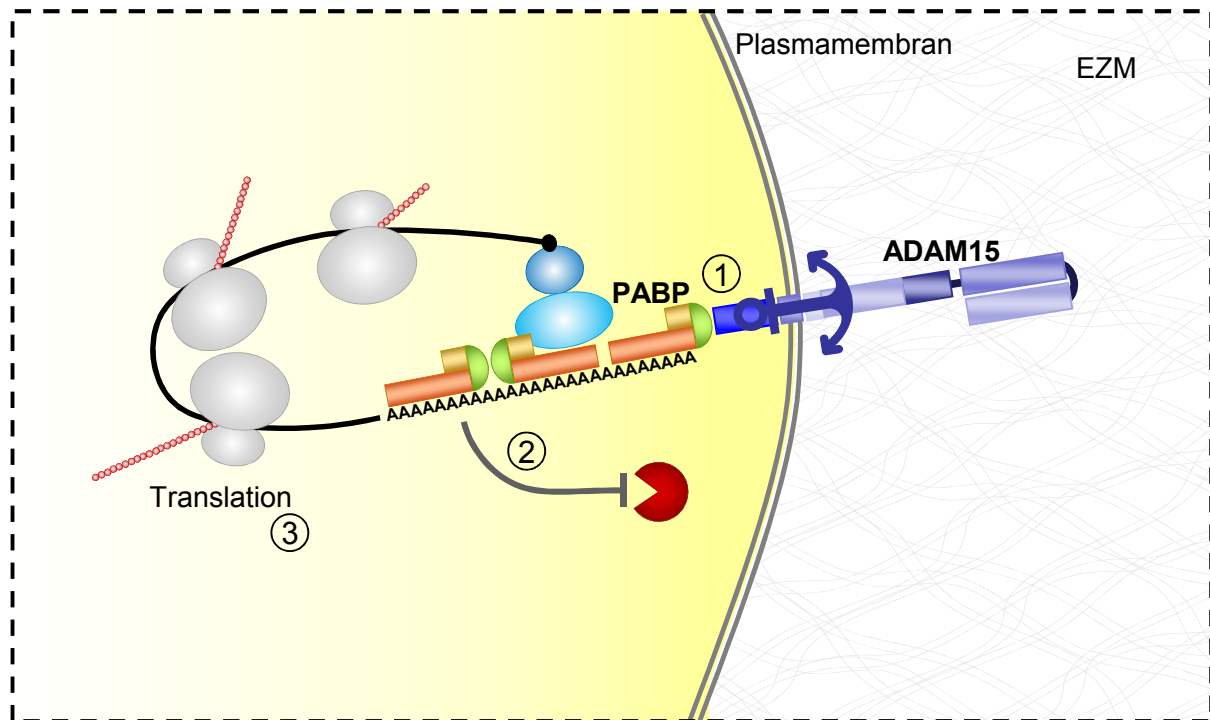


Abbildung 42: Hypothese zur Funktion der Bindung von PABP an ADAM15. ADAM15 könnte zur Anreicherung der mRNA an der Plasmamembran beitragen, indem es das mRNA-bindende Protein PABP verankert (1) und/oder durch die Anreicherung von PABP die mRNA vor der Degradation durch Deadenylasen schützt (2). Folglich könnte die mRNA an der Plasmamembran translatiert und Proteine exprimiert werden, die möglicherweise zur Adhäsion der Zelle beitragen (3).

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

ADAM15	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase 15</i>
ADAM15ΔZyto	ADAM15 ohne zytoplasmatische Domäne
Akt	Protein Kinase B (auch PKB)
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary Cell</i>
CII	<i>Collagen Type II</i> (Kollagen Typ II)
ZytoADAM15	Zytoplasmatischen Domäne von ADAM15
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
eIF	<i>eukaryotic Initiation Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAT	<i>Focal Adhesion Targeting Domain</i>
FRNK	<i>FAK-related non-kinase</i>
GFR	<i>Growth Factor Receptor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEK	<i>Human Embryonic Kidney Cell</i>
IB	Immunblot
IP	Immunpräzipitation
M2H	<i>Mammalian Two-Hybrid Assay</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
OA	Osteoarthrose
OD	Optische Dichte
PABC	C-terminale Domäne von PABP
PABP	<i>Poly(A)-Binding Protein</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRM	<i>RNA Recognition Motive</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SH3	Src-homology 3
TACE	<i>Tumor necrosis factor α Converting Enzyme</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett

5.2 Material

5.2.1 Oligonukleotide

Primer-Sequenzen zur Klonierung von ADAM15-, FAK- und PABP-Konstrukten für *Mammalian Two-Hybrid Assay* und Proteinexpression

ADAM15 (zytopl. Domäne)	For Rev	AGGATCCATGTACCGTGCCCGCCTGCACCA TGCGGCCGCCTAGAGGTAGAGCGAGGACACTGT
FAK 33-355	For Rev	TAGGATCCGGTGCAATGGAGCGAGTATTAAAG TTGCGGCCGCCTACGAGGTTCCATTACCAGC
FAK 422-676	For Rev	AGGATCCATAGAACTTG GACGATGTATTGGAGAAG AGCGGCCGCCTAGAGCTGAGCTTTAAGTTCAGTAAACC
FAK 707-1052	For Rev	TAGGATCCGGGTCTGATGAAGCACCGCCCAA TGCGGCCGCCTAGTGTGGTCTCGTCTGCCCAAGCA
FAK 707-913	For Rev	TAGGATCCGGGTCTGATGAAGCACCGCCCAA TGCGGCCGCCTAAGGAGGGGGGCTGATTTCTCTG
FAK 914-1052	For Rev	AGGATCCACTGCCAACCTGGACCGGTCTG TGCGGCCGCCTAGTGTGGTCTCGTCTGCCCAAGCA
FAK 707-850	For Rev	TAGGATCCGGGTCTGATGAAGCACCGCCCAA TGCGGCCGCCTTTCCAATCGGACCCTGAAGACT
FAK 707-770	For Rev	TAGGATCCGGGTCTGATGAAGCACCGCCCAA AGCGGCCGCCTCCAAAAGAGATGCCTGACCT
FAK 730-790	For Rev	AGGATCCTATCCCAGCCCACAGCACATGGT AGCGGCCGCCTAGTCCTCCACATTGGGCTGCCAC
FAK 730-775	For Rev	AGGATCCTATCCCAGCCCACAGCACATGGT AGCGGCCGCCTAATTCCATGAATCTGTTTGGACCTGG
FAK 740-790	For Rev	AGGATCCAATCATTACCAGGTTTCTGGCTACCC AGCGGCCGCCTAGTCCTCCACATTGGGCTGCCAC
FAK 750-850	For Rev	TGGATCCTCACATGGAATCACAGCCATGGCT AGCGGCCGCCTAACTTCCATCCTCCCTGTCAATACTG
FAK 770-850	For Rev	AGGATCCTAGACCTCAGGAGATAGCAATGTGG AGCGGCCGCCTAACTTCCATCCTCCCTGTCAATACTG
PABP 1-192	For Rev	TAGGATCCGCTATGAACCCCAGTGCCCCCA TTGCGGCCGCCTATTCTTTTGGCCTAGCTCCAAGTT
PABP 182-371	For Rev	TAGGATCCATGGAACCTTGGAGCTAGGGCAA TTGCGGCCGCCTATTTGCGCTGAGCTAAAGCTAC
PABP 366-636	For Rev	TAGGATCCATGGCTTTAGCTCAGCGCAAAGAAGA TGCGGCCGCCTAAACAGTTGGAACACCGGTGGCA
PABP 392-636	For Rev	TGGATCCATGCCCAACCCTGTAATCAACCCCTA TGCGGCCGCCTAAACAGTTGGAACACCGGTGGCA
PABP 471-636	For Rev	TGGATCCATGTACAGGTTCCACGAGTCATGTCA TGCGGCCGCCTAAACAGTTGGAACACCGGTGGCA

PABP 552-636	For Rev	TAGGATCCATGTCTGCCCCCTCCTCAAGAGCAAA TGCGGCCGCCTAAACAGTTGGAACACCGGTGGCA
PABP 392-470	For Rev	TGGATCCATGCCCAACCCTGTAATCAACCCCTA TGCGGCCGCCTAAGAAGCTGGTCTCATAGTACTAAATGG
PABP 392-553	For Rev	TGGATCCATGCCCAACCCTGTAATCAACCCCTA TGCGGCCGCCTAGGCAGATGCCAACATGGAAGCA
PABP 366-553	For Rev	TAGGATCCATGGCTTTAGCTCAGCGCAAAGAAGA TGCGGCCGCCTAGGCAGATGCCAACATGGAAGCA
PABP 471-553	For Rev	TGGATCCATGTCACAGGTTCCACGAGTCATGTCA TGCGGCCGCCTAGGCAGATGCCAACATGGAAGCA

Sequenzierungsprimer

BD5up	AGC ATA GAA TAA GTG CGA C
AD5up	GGA GAT GAA GAC TTC TCC T
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
pGEX 5'	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG
pGEX 3'	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG
pGEX For	CCA GCA AGT ATA TAG CAT GG
pGEX Rev	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG

5.2.2 Vektoren

Name	Beschreibung	Hersteller
pGEM-T Easy	Vektor zur Zwischenklonierung mit T-Overhang	Promega, Mannheim, DE
pCMV-AD	<i>prey</i> -Vektor für <i>Mammalian Two-Hybrid</i>	Stratagene, Zuidoost, NE
pCMV-BD	<i>bait</i> -Vektor für <i>Mammalian Two-Hybrid</i>	Stratagene, Zuidoost, NE
pFR-Luc	Firefly Luciferase Vektor für <i>Mammalian Two-Hybrid</i>	Stratagene, Zuidoost, NE
pRL-TK	<i>Renilla</i> Luciferase Vektor für <i>Mammalian Two-Hybrid</i>	Promega, Mannheim, DE
pGEX-6P-3	Proteinexpression in Bakterien mit <i>GST-tag</i>	GE Healthcare, München, DE
pExchange-1	Expressionsvektor in Mammalierzellen	Stratagene, Zuidoost, NE

5.2.1 Reaktionssysteme (Kits)

Kit	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, DE
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega, Mannheim, DE
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, DE

5.2.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i>-Bakterienstamm	Genotyp
XL1 Blue (Stratagene, Zuidoost, NE)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 subE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq ZWM15 Tn10(tetr)</i>]
DH5α (Stratagene, Zuidoost, NE)	F ⁻ Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
BL21(DE3)pLysS (Merck, Darmstadt, DE)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm gal λ</i> (DE3) pLysS (Cm ^r)
Rosetta 2(DE3)pLysS (Merck, Darmstadt, DE)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cm ^r)

5.2.3 Zellen

Name	Beschreibung	Quelle/Hersteller
HEK 293T	Human Embryonic Kidney Cells; primäres, embryonales Nierengewebe, adhären	Zelllinie, St. Stein (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt)
K4IM	Synovialfibroblasten, human; mit SV40 T Antigen immortalisiert [210], adhären	Zelllinie
HeLa	humane Epithelzellen des Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks [211], adhären	Zelllinie
T/C28a4 Chondrozyten	humane Chondrozyten [145], adhären	Zelllinie, Dr. M. B. Goldring (Hospital for Special Surgery, New York, NY)
OA-Chondrozyten	humane Osteoarthrose-Chondrozyten, adhären	Primäre Zellen (Friedrichsheim, Frankfurt)

5.2.4 Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller	Verwendung
Sekundärantikörper			
Anti-Maus HRP	Ziege	Dako, Hamburg, DE	WB
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	Dako, Hamburg, DE	WB
Anti-Schaf HRP	Kaninchen	Dako, Hamburg, DE	WB
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Huhn	Life Technologies, Darmstadt, DE	IF
Anti-Ziege Alexa Fluor 488	Esel	Life Technologies, Darmstadt, DE	IF, DZ
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE	IF
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE	IF
Anti-Maus Alexa Fluor 594	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE	IF
Primärantikörper			
anti-Glutathion-S-Transferase HRP		Sigma-Aldrich, Hamburg, DE	WB, ELISA
anti-ADAM15 (Cytoplasmic domain)	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK	WB
anti-ADAM15 (Ectodomain)	Ziege	R&D Systems, Wiesbaden, DE	WB, IF, IP, DZ
anti-ADAM15 (Ectodomain)	Maus	R&D Systems, Wiesbaden, DE	WB, IP
anti-ADAM15 (Prodomain)	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK	WB
anti-BCL2	Maus	Dako, Hamburg, DE	WB
anti-CD25 human, clone 7G7B6	Maus	Ancell, Hamburg, DE	WB, IP

anti-FAK (phospho Y397)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE	WB
anti-FAK (phospho Y576/577)	Kaninchen	Epitomics, Burlingame, USA	WB
anti-FAK (phospho Y861)	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK	WB
anti-FAK, clone 4.47	Maus	Merck, Darmstadt, DE	IF
anti-GAPDH	Kaninchen	Epitomics, Burlingame, USA	WB
anti-Myc Tag, clone 4A6	Maus	Merck, Darmstadt, DE	WB
anti-p53	Maus	Becton Dickinson, Heidelberg, DE	WB
anti-PABP	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK	WB, IF
anti-PABP, clone 10E10	Maus	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE	WB, IP
anti-Puromycin, clone 12D10	Maus	Merck, Darmstadt, DE	WB, IF
anti- β -Tubulin	Kaninchen	Epitomics, Burlingame, USA	WB

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz; IP: Immunpräzipitation, DZ: Durchflusszytometrie, ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

5.2.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Hersteller
8-well Zellkulturkammer aus PCA	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Agarose-Gelelektrophoresekammer	peqlab, Erlangen, DE
Biofuge fresco Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg, DE
CO ₂ -Inkubator HeraCell	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Elektrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, München, DE
FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Fastblot B44 Blotkammer	Biometra, Göttingen, DE
Feinwaage XS205	Mettler Toledo, Gießen, DE
HeraSafe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
LSM 510 Meta Laser Scanning Microscope	Zeiss, Jena, DE
MaxiSorp Nunc ELISA Platten	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Mighty Small II Gelelektrophoresekammer	GE Healthcare, München, DE
Mikroskop AxioImager.Z1	Zeiss, Jena, DE
Mithras LB940 Plattenleser	Berthold, Bad Wildbad, DE
OptimaMax XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, DE
PCR-Cycler	MJ Research, Watertown, USA
red Geldokumentation	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Sonoplus Sonifikator	Bandelin, Berlin, DE
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, DE
Zellkultur-Flaschen (75 cm ²), -Schalen (100 mm) und -Platten (24-, 96-well)	Greiner, Frickenhausen, DE
Zentrifuge Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Newtown, USA

5.2.6 Software

Programm	Verwendung	Referenz
Axiolmager 4.6.	Aufnahme von Bildern am Epifluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, DE
Cylogic	Auswertung und Darstellung der Durchflusszytometrie	P. Terho, freie Software
Excel	Statistische Auswertungen und Dokumentation	Microsoft Corporation, Redmond, USA
FinchTV	Analyse von DNA-Sequenzierungen	Geospiza Inc., Seattle, USA
ImageJ 1.47	Bearbeitung von Bildern aus mikroskopischen Aufnahmen	W. Rasband, freie Software
NCBI Standard Nucleotide Blast	Analyse von DNA-Sequenzierungen	http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov
ZEN 2008	Aufnahme von Bildern am Konfokalmikroskop	Zeiss, Jena, DE
Adobe Photoshop CS2	Bearbeitung von Bildern	Adobe Systems GmbH, München, DE

5.2.7 Reagenzien, Medien und Enzyme

	Hersteller
Molekularbiologische Methoden	
1 kb Ladder	Roth, Karlsruhe, DE
100 bp Ladder	Life Technologies, Darmstadt, DE
ABTS	Roche, Mannheim, DE
Agar	Roth, Karlsruhe, DE
Agarose	Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Merck, Darmstadt, DE
Chloramphenicol	Applichem, Darmstadt, DE
dNTPs	Life Technologies, Darmstadt, DE
DTT	Life Technologies, Darmstadt, DE
Kanamycindisulfat	Merck, Darmstadt, DE
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, DE
Loading Dye Agarose-Gel	Roth, Karlsruhe, DE
oligo dT	Life Technologies, Darmstadt, DE
PCR Puffer (high yield) (10x)	peqlab, Erlangen, DE
pGEM T Easy Vector System I	Promega, Mannheim, DE
Phusion Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Phusion Polymerase-Puffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Primer	Metabion, Martinsried, DE / Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
Rapid Ligation Buffer	Promega, Mannheim, DE
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Rosetta2(DE3)pLysS	Merck, Darmstadt, DE
T4 Ligase	Promega, Mannheim, DE
Taq Polymerase	peqlab, Erlangen, DE
Taq Polymerase-Puffer (10x)	peqlab, Erlangen, DE

Zellbiologische Methoden	
Camptothecin	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose)	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham)	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
DMSO	Merck, Darmstadt, DE
FCS	Life Technologies, Darmstadt, DE
Interleukin-2 human	Biomol, Hamburg, DE
JetPEI	Polyplus Transfection, Darmstadt, DE
Kollagenase	Serva, Heidelberg, DE
Mammalian Two Hybrid Assay Kit	Stratagene, Zuidoost, NE
PBS (Dulbecco's Phosphate buffered Saline, without Mg^{2+} and Ca^{2+})	Life Technologies, Darmstadt, DE
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Pronase	Merck, Darmstadt, DE
Puromycin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Saint-Red	Synvolux Therapeutics, Groningen, NL
siRNA	Life Technologies, Darmstadt, DE
Trypsin	Lonza, Basel, CH
Proteinbiochemische Methoden	
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Benzonase Nuclease	Merck, Darmstadt, DE
Blottingmembran Hybond-C Extra	GE Healthcare, München, DE
BugBuster	Merck, Darmstadt, DE
complete Mini/EDTA-free Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim, DE
ECL Western Lightning Plus	PerkinElmer, Rodgau, DE
EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Glutathion	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
GSH-Sepharose	GE Healthcare, München, DE
IPTG	Applichem, Darmstadt, DE
Lysozym	Merck, Darmstadt, DE
Marker PageRuler prestained	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Marker PageRuler unstained	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Milchpulver, fettarm	Roth, Karlsruhe, DE
Phosphataseinhibitor-Cocktail II und III	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
PlusOne Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350	GE Healthcare, München, DE
PreScission Protease / 3C-Express	Life Technologies, Darmstadt, DE / Expedeon, Cambridge, UK
Protein A/G Agarose	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Streptavidin Magnetkügelchen	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Zellfärbung	
BSA	Roth, Karlsruhe, DE
Kollagen Typ II	MD Biosciences, Zürich, CH
Cycloheximid	Applichem, Darmstadt, DE
DAPI	Applichem, Darmstadt, DE
EDT	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg, DE
Saponin	Sigma-Aldrich, Hamburg, DE

5.2.8 SDS-Gel

SDS-Trenngel			SDS-Sammelgel	
	10%	14%		4%
dH ₂ O	5,32 ml	4,32 ml	dH ₂ O	2,52 ml
Acrylamid 40 % (w/v)	2,5 ml	3,5 ml	Acrylamid 40 % (w/v)	400 µl
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	2 ml	2 ml	Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	1 ml
SDS 10 % (w/v)	100 µl	100 µl	SDS 10 % (w/v)	40 µl
TEMED	20 µl	20 µl	TEMED	8 µl
APS 10 % (w/v)	140 µl	140 µl	APS 10 % (w/v)	60 µl

5.3 Literaturverzeichnis

- 1 Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E (2011) The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 1270-1285.
- 2 Felson DT (2004) Risk factors for osteoarthritis: understanding joint vulnerability. *Clin Orthop Relat Res* **427**, 16-21.
- 3 Spector TD, Cicuttini J, Baker J, Loughlin J, Hart D (1996) Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**, 940-944.
- 4 Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK: Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008; 9: 132.
- 5 Krauss I, Steinhilber B, Haupt G, Miller R, Martus P, Janssen P (2014) Exercise therapy in hip osteoarthritis - a randomized controlled trial. *Dtsch Arztebl Int* **111**, 592-599.
- 6 Roubille C, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2013) Osteoarthritis treatments: where do we stand at the moment? *Medicographia* **35**, 172-180.
- 7 Martel-Pelletier J (1999) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 371-373.
- 8 Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012) Osteoarthritis A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum* **64**, 1697-1707.
- 9 Troeberg L, Nagase H (2012) Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 133-145.
- 10 Aigner T, Zizn A, Gehsitz A, Gebhard PM, McKenna LA (2001) Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA array technology. *Arthritis Rheum* **44** 2777-2789.
- 11 Aigner T, Cook JL, Gerwin N, Glasson SS, Lavery S, Little CB, McIlwraith W, Kraus VB (2010) Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, Suppl 3:S2-6.
- 12 Aigner T, Stöve J (2003) Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1569-1593.
- 13 Kuettner KE (1992) Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* **25**, 155-163.
- 14 Matyas JR, Adams ME, Huang D, Sandell LJ (1995) Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **38**, 420-425.

- 15 Aigner T, Glückert K, von der Mark K (1997) Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage* **5**, 83-89.
- 16 Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J (2007) Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis-structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**, 391-399.
- 17 Aigner T, Bertling W, Stöss H, Weseloh G, von der Mark K (1993) Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **91**, 829-837.
- 18 Del Carlo M Jr, Loeser RF (2008) Cell death in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* **10**, 37-42.
- 19 Gebhard PM, Söder S, Bau B, Aigner T (2004) Downregulation of the GTPase RhoB might be involved in the pre-apoptotic phenotype of chondrocytes. *Frontiers in Bioscience* **9**, 827-833.
- 20 Böhm BB, Aigner T, Gehrsitz A, Blobel CP, Kalden JR, Burkhardt H (1999) Up-regulation of MDC15 (metargidin) messenger RNA in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* **42** 1946-1950.
- 21 Primakoff P, Myles DG (2000) The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* **16**, 83-87.
- 22 Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* **29**, 258-289.
- 23 White JM, Wolfsberg TG (updated on 9/20/05) Table of the ADAMs. University of Virginia School of Medicine Department of Cell Biology. <http://people.virginia.edu/~jw7g/>
- 24 Weskamp, G Blobel CP (1994) A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 2748-2751.
- 25 Tang BL, Hong W (1999) ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin repeats. *FEBS Lett* **445**, 223-225.
- 26 Fox JW, Serrano SM (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* **45**, 969-985.
- 27 Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ (1994) Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol* **31**, 289-300.
- 28 Takeda S, Takeya H, Iwanaga S (2012) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 164-176.
- 29 Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turns)

- and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Lett* **331**, 134-140.
- 30 Stöcker W, Bode W (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 383-390.
 - 31 Grams F, Huber R, Kress LF, Moroder L, Bode W (1993) Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett* **335**, 76-80.
 - 32 Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K, Nakayama K (1991) Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **266**, 12127-12130.
 - 33 Lum L, Reid MS, Blobel CP (1998) Intracellular Maturation of the Mouse Metalloprotease Disintegrin MDC15. *J Biol Chem* **273**, 26236–26247.
 - 34 Dallas DJ, Genever PG, Patton AJ, Millichip MI, McKie N, Skerry TM (1999) Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone. *Bone* **25**, 9-15.
 - 35 Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* **347**, 131-138.
 - 36 Böhm BB, Schirner A, Burkhardt H (2009) ADAM15 modulates outside-in signalling in chondrocyte–matrix interactions. *J Cell Mol Med* **13**, 2634–2644.
 - 37 Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
 - 38 Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* **164**, 769-779.
 - 39 Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, McGowan PM (2011) The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics* **8**, 9.
 - 40 Kenny PA, Bissell MJ (2007) Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer. *J Clin Invest* **117**, 337-345.
 - 41 Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9182-9187.
 - 42 Baum B, Georgiou M (2011) Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* **192**, 907-917.

-
- 43 Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* **68**, 3645-3654.
 - 44 Najy AJ, Day KC, Day ML (2008) The Ectodomain Shedding of E-cadherin by ADAM15 Supports ErbB Receptor Activation. *J Biol Chem* **283**, 18393–18401.
 - 45 McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1263-1284.
 - 46 Millichip MI, Dallas DJ, Wu E, Dale S, McKie N (1998) The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 594-598.
 - 47 Martin J, Eynstone LV, Davies M, Williams JD, Steadman R (2002) The Role of ADAM 15 in Glomerular Mesangial Cell Migration. *J Biol Chem* **277**, 33683-33689.
 - 48 Zhu X, Bansal NP, Evans JP (2000) Identification of Key Functional Amino Acids of the Mouse Fertilin β (ADAM2) Disintegrin Loop for Cell-Cell Adhesion during Fertilization. *J Biol Chem* **275**, 7677-7683.
 - 49 Cal S, Freije JM, López JM, Takada Y, López-Otín C (2000) ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha v \beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **11**, 1457-1169.
 - 50 Stupack DG (2007) The biology of integrins. *Oncology (Williston Park)* **21**, 6-12.
 - 51 Zhang XP, Kamata T, Yokoyama K, Puzon-McLaughlin W, Takada Y (1998) Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin $\alpha v \beta 3$. *J Biol Chem* **273**, 7345-7350.
 - 52 Nath D, Slocombe, PM, Stephens PE, Warn A, Hutchinson GR, Yamada KM, Docherty AJ, Murphy G (1999) Interaction of metargidin (ADAM-15) with $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci* **112**, 579–587
 - 53 Felding-Habermann B, Cheresh DA (1993) Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 864-868.
 - 54 Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM (2009) Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. *Clin Cancer Res* **15**, 1140-1144.
 - 55 Beck V, Herold H, Benge A, Luber B, Hutzler P, Tschesche H, Kessler H, Schmitt M, Geppert HG, Reuning U (2005) ADAM15 decreases integrin $\alpha v \beta 3$ /vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 590-603.

-
- 56 Zhong JL, Poghosyan Z, Pennington CJ, Scott X, Handsley MM, Warn A, Gavrilovic J, Honert K, Krüger A, Span PN, Sweep FC, Edwards DR (2008) Distinct functions of natural ADAM-15 cytoplasmic domain variants in human mammary carcinoma. *Mol Cancer Res* **6**, 383-394.
- 57 Najy AJ, Day KC, Day ML (2008) ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res* **68**, 1092-1099.
- 58 Chen Q, Meng LH, Zhu CH, Lin LP, Lu H, Ding J (2008) ADAM15 suppresses cell motility by driving integrin $\alpha 5 \beta 1$ cell surface expression via Erk inactivation. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2164–2173.
- 59 Herren B, Garton KJ, Coats S, Bowen-Pope DF, Ross R, Raines EW (2001) ADAM15 overexpression in NIH3T3 cells enhances cell-cell interactions. *Exp Cell Res* **271**, 152-160.
- 60 Kuefer R, Day KC, Kleer CG, Sabel MS, Hofer MD, Varambally S, Zorn CS, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML (2006) ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease. *Neoplasia* **8**, 319-329.
- 61 Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM (1999) Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin α) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* **154**, 1489-1501.
- 62 Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM (2008) Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1685-1702.
- 63 Ebsen H, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O (2014) Identification of SH3 Domain Proteins Interacting with the Cytoplasmic Tail of the A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10). *PLoS One* **9**, e102899.
- 64 Howard L, Nelson KK, Maciewicz RA, Blobel CP (1999) Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem* **274**, 31693-31699.
- 65 Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A (2000) Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J* **352**, 883-892.
- 66 Suzuki A, Kadota N, Hara T, Nakagami Y, Izumi T, Takenawa T, Sabe H, Endo T (2000) Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene* **19**, 5842-5850.
- 67 Abram CL, Seals DF, Pass I, Salinsky D, Maurer L, Roth TM, Courtneidge SA (2003) The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem* **278**, 16844-16851.
- 68 Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A (2001) Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85alpha activates phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells. *J Biol Chem* **276**, 24466-24472.

-
- 69 Frame MC (2004) Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* **117**, 989-998.
 - 70 Kim LC, Song L, Haura EB (2009) Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 587-595.
 - 71 Stautz D, Sanjay A, Hansen MT, Albrechtsen R, Wewer UM, Kveiborg M (2010) ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity. *Exp Cell Res* **316**, 55-67.
 - 72 Leyme A, Bourd-Boittin K, Bonnier D, Falconer A, Arlot-Bonnemains Y, Théret N (2012) Identification of ILK as a new partner of the ADAM12 disintegrin and metalloprotease in cell adhesion and survival. *Mol Biol Cell* **23**, 3461-3472.
 - 73 Krätzschmar J, Lum L, Blobel CP (1996) Metargidin, a Membrane-anchored Metalloprotease-Disintegrin Protein with an RGD Integrin Binding Sequence. *J Biol Chem* **271**, 4593-4596.
 - 74 Gupta GP, Massagué J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**, 679-695.
 - 75 Burdelski C, Fitzner M, Hube-Magg C, Kluth M, Heumann A, Simon R, Krech T, Clauditz T, Büscheck F, Steurer S, Wittmer C, Hinsch A, Luebke AM, Jacobsen F, Minner S, Tsourlakis MC, Beyer B, Steuber T, Thederan I, Sauter G, Izbicki J, Schlomm T, Wilczak W (2017) Overexpression of the A Disintegrin and Metalloproteinase ADAM15 is linked to a Small but Highly Aggressive Subset of Prostate Cancers. *Neoplasia* **19**, 279-287.
 - 76 Horiuchi K, Weskamp G, Lum L, Hammes HP, Cai H, Brodie TA, Ludwig T, Chiusaroli R, Baron R, Preissner KT, Manova K, Blobel CP (2003) Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol Cell Biol* **23**, 5614-5624.
 - 77 Valkovskaya N, Kaye H, Felix K, Hartmann D, Giese NA, Osinsky SP, Friess H, Kleeff J (2007) ADAM8 expression is associated with increased invasiveness and reduced patient survival in pancreatic cancer. *J Cell Mol Med* **11**, 1162-1174.
 - 78 Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H, Röcken C (2005) Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* **131**, 41-48.
 - 79 O'Shea C, McKie N, Buggy Y, Duggan C, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ (2003) Expression of ADAM9 mRNA and protein in breast cancer. *Int J Cancer* **105**, 754-761.
 - 80 Arima T, Enokida H, Kubo H, Kagata I, Matsuda R, Toki K, Nishimura H, Chiyomaru T, Tatarano S, Idesako T, Nishiyama K, Nakagawa M (2007) Nuclear translocation of ADAM-10 contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Sci* **11** 1720-1726.
 - 81 Fritzsche FR, Jung M, Tölle A, Wild P, Hartmann A, Wassermann K, Rabien A, Lein M, Dietel M, Pilarsky C, Calvano D, Grützmann R, Jung K, Kristiansen G (2007) ADAM9 Expression is a

-
- Significant and Independent Prognostic Marker of PSA Relapse in Prostate Cancer. *Eur Urol* **54**, 1097-1106.
- 82 Ko SY, Lin SC, Wong YK, Liu CJ, Chang KW, Liu TY (2007) Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* **245**, 33-43.
- 83 Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P (2003) L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* **362**, 869-875.
- 84 Maretzky T, Blobel CP, Guaiquil V (2014) Characterization of oxygen-induced retinopathy in mice carrying an inactivating point mutation in the catalytic site of ADAM15. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 6774-6782.
- 85 Kleino I, Ortiz RM, Huovila AP (2007) ADAM15 gene structure and differential alternative exon use in human tissues. *BMC Mol Biol* **8**, 90.
- 86 Mosnier JF, Jarry A, Bou-Hanna C, Denis MG, Merlin D, Laboisse CL (2006) ADAM15 upregulation and interaction with multiple binding partners in inflammatory bowel disease. *Lab Invest* **86**, 1064-1073.
- 87 Böhm BB, Aigner T, Blobel CP, Kalden JR, Burkhardt H (2001) Highly enhanced expression of the disintegrin metalloproteinase MDC15 (metargidin) in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* **44**, 2046-2054.
- 88 Sun C, Wu MH, Guo M, Day ML, Lee ES, Yuan SY (2010) ADAM15 regulates endothelial permeability and neutrophil migration via Src/ERK1/2 signalling. *Cardiovasc Res* **87**, 348-355.
- 89 Sun C, Wu MH, Lee ES, Yuan SY (2012) A disintegrin and metalloproteinase 15 contributes to atherosclerosis by mediating endothelial barrier dysfunction via Src family kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 2444-2451.
- 90 Böhm BB, Freund I, Krause K, Kinne RW, Burkhardt H (2013) ADAM15 adds to apoptosis resistance of synovial fibroblasts by modulating focal adhesion kinase signaling. *Arthritis Rheum* **65**, 2826-2834.
- 91 Patel IR, Mukundan GA, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, Amin AR (1998) TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J Immunol* **160**, 4570-4579.
- 92 Chubinskaya S, Cs-Szabo G, Kuettner KE (1998) ADAM-10 message is expressed in human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* **46**, 723-730.

-
- 93 Böhm BB, Aigner T, Roy B, Brodie TA, Blobel CP, Burkhardt H (2005) Homeostatic effects of the metalloproteinase disintegrin ADAM15 in degenerative cartilage remodeling. *Arthritis Rheum* **52**, 1100–1109.
- 94 Böhm B, Hess S, Krause K, Schirner A, Ewald W, Aigner T, Burkhardt H (2010) ADAM15 exerts an antiapoptotic effect on osteoarthritic chondrocytes via up-regulation of the X-linked inhibitor of apoptosis. *Arthritis Rheum* **62**, 1372–1382.
- 95 Kurz B, Lemke A, Kehn M, Domm C, Patwari P, Frank EH, Grodzinsky AJ, Schünke M (2004) Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. *Arthritis Rheum* **50**, 123–130.
- 96 Regan E, Flannelly J, Bowler R, Tran K, Nicks M, Carbone BD, Glueck D, Heijnen H, Mason R, Crapo J (2005) Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **52**, 3479–3491.
- 97 Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, Antony S, Meng L, Liao Z, Kohlhagen G, Zhang H, Kohn KW (2003) Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* **532**, 173–203.
- 98 Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, McKenna L (2001) Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum* **44**, 1304–1312.
- 99 Roach HI, Aigner T, Kouri JB (2004) Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* **9**, 265–277.
- 100 Lee D, Long SA, Adams JL, Chan G, Vaidya KS, Francis TA, Kikly K, Winkler JD, Sung CM, Debouck C, Richardson S, Levy MA, DeWolf WE Jr, Keller PM, Tomaszek T, Head MS, Ryan MD, Haltiwanger RC, Liang PH, Janson CA, McDevitt PJ, Johanson K, Concha NO, Chan W, Abdel-Meguid SS, Badger AM, Lark MW, Nadeau DP, Suva LJ, Gowen M, Nuttall ME (2000) Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem* **275**, 16007–16014.
- 101 Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ (2004) Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 103–119.
- 102 Lechertier T, Hodivala-Dilke K (2012) Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. *J Pathol* **226**, 404–412.
- 103 Schaller MD (2010) Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* **123**, 1007–1013.

-
- 104 Ceccarelli DF, Song HK, Poy F, Schaller MD, Eck MJ (2006) Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **281**, 252-259.
- 105 Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ (2007) Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* **129**, 1177-1187.
- 106 Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* **2**, 249-256.
- 107 Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **130**, 1181-1187.
- 108 Cai X, Lietha D, Ceccarelli DF, Karginov AV, Rajfur Z, Jacobson K, Hahn KM, Eck MJ, Schaller MD (2008) Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol* **28**, 201-214.
- 109 Toutant M, Costa A, Studler JM, Kadaré G, Carnaud M, Girault JA (2002) Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**, 7731-7743.
- 110 Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM (2010) Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**, 580-584.
- 111 Brown MC, Turner CE (2004) Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* **84**, 1315-1339.
- 112 Fang X, Liu X, Yao L, Chen C, Lin J, Ni P, Zheng X, Fan Q (2014) New insights into FAK phosphorylation based on a FAT domain-defective mutation. *PLoS One* **9**, e107134.
- 113 Gervais FG, Thornberry NA, Ruffolo SC, Nicholson DW, Roy S (1998) Caspases Cleave Focal Adhesion Kinase during Apoptosis to Generate a FRNK-like Polypeptide. *J Biol Chem* **273**, 17102-17108.
- 114 Richardson A, Parsons T (1996) A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK. *Nature* **380**, 538-540.
- 115 Arold ST (2011) How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action. *Curr Opin Struct Biol* **21**, 808-813.
- 116 Calalb MB, Polte TR, Hanks SK (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* **15**, 954-963.
- 117 Parsons JT (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* **116**, 1409-1416.
- 118 Ilić D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* **377**, 539-544.
- 119 Ilic D, Kovacic B, McDonagh S, Jin F, Baumbusch C, Gardner DG, Damsky CH (2003) Focal adhesion kinase is required for blood vessel morphogenesis. *Circ Res* **92**, 300-307.

-
- 120 Golubovskaya VM, Kweh FA, Cance WG (2009) Focal adhesion kinase and cancer. *Histol Histopathol* **24**, 503-510.
- 121 Görlach M, Burd CG, Dreyfuss G (2011) The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* **211**, 400-407.
- 122 Sachs AB, Davis RW, Kornberg RD (1987) A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol* **7**, 3268-3276.
- 123 Baer BW, Kornberg RD (1983) The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* **96**, 717-721.
- 124 Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK. (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**, 835-845.
- 125 Burd CG, Matunis EL, Dreyfuss G (1991) The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol* **11**, 3419-3424.
- 126 Melo EO, Dhalia R, Martins de Sa C, Standart N, de Melo Neto OP (2003) Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem* **278**, 46357–46368.
- 127 Lin J, Fabian M, Sonenberg N, Meller A (2012) Nanopore Detachment Kinetics of Poly(A) Binding Proteins from RNA Molecules Reveals the Critical Role of C-Terminus Interactions. *Biophys J* **102**, 1427-1434.
- 128 Roy G, De Crescenzo G, Khaleghpour K, Kahvejian A, O'Connor-McCourt M, Sonenberg N (2002) Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol Cell Biol* **22**, 3769-3782.
- 129 Hoshino S, Imai M, Kobayashi T, Uchida N, Katada T (1999) The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem* **274**, 16677-16680.
- 130 Khaleghpour K, Kahvejian A, De Crescenzo G, Roy G, Svitkin YV, Imataka H, O'Connor-McCourt M, Sonenberg N (2001) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol* **21**, 5200-5213.
- 131 Lemay JF, Lemieux C, St-André O, Bachand F (2010) Crossing the borders: Poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol* **7**, 291-295.
- 132 Gray NK, Wickens MP (1998) Control of translation initiation in animals. *Ann Rev Cell Dev Biol* **14**, 399-458.
- 133 Zhouravleva G, Frolova L, Le Goff X, Le Guellec R, Inge-Vechtormov S, Kisselev L, Philippe M (1995) Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J* **14**, 4065-4072.

-
- 134 Tarun SZ, Sachs AB (1995) A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev* **9**, 2997-3007.
- 135 Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**, 135-140.
- 136 Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ, Gallie DR (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)- binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* **272**, 16247-16255.
- 137 Khaleghpour K, Svitkin YV, Craig AW, DeMaria CT, Deo RC, Burley SK, Sonenberg N (2001) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* **7**, 205-216.
- 138 Le H, Browning KS, Gallie DR (2000) The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B. *J Biol Chem* **275**, 17452-17462.
- 139 Fraser CS, Pain VM, Morley SJ (1999) The association of initiation factor 4F with poly(A)-binding protein is enhanced in serum-stimulated *Xenopus* kidney cells. *J Biol Chem* **274**, 196-204.
- 140 Lee J, Bedford MT (2002) PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep* **3**, 268-273.
- 141 Willett M, Brocard M, Davide A, Morley SJ (2011) Translation initiation factors and active sites of protein synthesis co-localize at the leading edge of migrating fibroblasts. *Biochem J* **438**, 217-227.
- 142 Eliscovich C, Buxbaum AR, Katz ZB, Singer RH (2013) mRNA on the move: the road to its biological destiny. *J Biol Chem* **288**, 20361-20368.
- 143 Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* **13**, 161-167.
- 144 Fried D, Böhm BB, Krause K, Burkhardt H (2012) ADAM15 Protein Amplifies Focal Adhesion Kinase Phosphorylation under Genotoxic Stress Conditions. *J Biol Chem* **287**, 21214-21223.
- 145 Finger F, Schörle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T (2003) Molecular Phenotyping of Human Chondrocyte Cell Lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum* **48**, 3395-3403.
- 146 Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P (2009) SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* **6**, 275-277.
- 147 Wolff B, Sanglier JJ, Wang (1997) Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* **4**, 139-147.

-
- 148 Aigner T, Dudhia (1997) Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *J Ann Rheum Dis* **56**, 287-291.
- 149 Huang K, Wu LD (2008) Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med Res* **36**, 1149-1160.
- 150 Pan D, Rubin GM (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* **90**, 271-280.
- 151 Tousseyn T, Thathiah A, Jorissen E, Raemaekers T, Konietzko U, Reiss K, Maes E, Snellinx A, Serneels L, Nyabi O, Annaert W, Saftig P, Hartmann D, De Strooper B (2009) ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem* **284**, 11738-11747.
- 152 Maretzky T, Yang G, Ouerfelli O, Overall CM, Worpenberg S, Hassiepen U, Eder J, Blobel CP (2009) Characterization of the catalytic activity of the membrane-anchored metalloproteinase ADAM15 in cell-based assays. *Biochem J* **420**, 105-113.
- 153 Golubovskaya VM, Gross S, Kaur AS, Wilson RI, Xu LH, Yang XH, Cance WG (2003) Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol Cancer Res* **10**, 755-764.
- 154 Zhao X, Guan JL (2011) Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* **63**, 610-615.
- 155 Rickles RJ, Botfield MC, Weng Z, Taylor JA, Green OM, Brugge JS, Zoller MJ (1994) Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J* **13**, 5598-5604.
- 156 Sparks AB, Rider JE, Hoffman NG, Fowlkes DM, Quillam LA, Kay BK (1996) Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1540-1544.
- 157 Mayer BJ (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* **114**, 1253-1263.
- 158 Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.
- 159 Ren XD, Kiosses WB, Sieg DJ, Otey CA, Schlaepfer DD, Schwartz MA (2000) Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci* **113**, 3673-3678.
- 160 Zouq NK, Keeble JA, Lindsay J, Valentijn AJ, Zhang L, Mills D, Turner CE, Streuli CH, Gilmore AP (2009) FAK engages multiple pathways to maintain survival of fibroblasts and epithelia: differential roles for paxillin and p130Cas. *J Cell Sci* **122**, 357-367.
- 161 Huang D, Khoe M, Befekadu M, Chung S, Takata Y, Ilic D, Bryer-Ash M (2007) Focal adhesion kinase mediates cell survival via NF-kappaB and ERK signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C1339-1352.

- 162 Lo SH (2006) Focal adhesions: what's new inside. *Dev Biol* **294**, 280-291.
- 163 Kasahara T, Koguchi E, Funakoshi M, Aizu-Yokota E, Sonoda Y (2002) Antiapoptotic action of focal adhesion kinase (FAK) against ionizing radiation. *Antioxid Redox Signal* **4**, 491-499.
- 164 Frisch SM, Vuori K, Ruoslathi E, Chan-Hui PY (1996) Control of adhesion dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* **134**, 793-799.
- 165 Reddig PJ, Juliano RL (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 425-439.
- 166 Lunn JA, Jacamo R, Rozengurt E (2007) Preferential phosphorylation of focal adhesion kinase tyrosine 861 is critical for mediating an anti-apoptotic response to hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **282**, 10370–10379
- 167 Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* **14**, 1680-1688.
- 168 Calalb MB, Zhang X, Polte TR, Hanks SK (1996) Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun* **228**, 662-668.
- 169 Maa MC, Leu TH (1998) Vanadate-dependent FAK activation is accomplished by the sustained FAK Tyr-576/577 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 344-349.
- 170 Thomas JW, Cooley MA, Broome JM, Salgia R, Griffin JD, Lombardo CR, Schaller MD (1999) The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *J Biol Chem* **274**, 36684-36692.
- 171 Bellis SL, Miller JT, Turner CE (1995) Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **270**, 17437-17441.
- 172 Deakin NO, Turner CE (2008) Paxillin comes of age. *J Cell Sci* **121**, 2435-2444.
- 173 Lim Y, Han I, Jeon J, Park H, Bahk YY, Oh ES (2004) Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* **279**, 29060-29065.
- 174 Rivera GM, Antoku S, Gelkop S, Shin NY, Hanks SK, Pawson T, Mayer BJ (2006) Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9536-9541.
- 175 Cunningham-Edmondson AC, Hanks SK (2009) p130Cas substrate domain signaling promotes migration, invasion, and survival of estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Breast Cancer (London)* **1**, 39-52.
- 176 Hauck CR, Sieg DJ, Hsia DA, Loftus JC, Gaarde WA, Monia BP, Schlaepfer DD (2001) Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res* **61**, 7079-7090.

-
- 177 Ostergaard K, Salter DM, Petersen J, Bendtzen K, Hvolris J, Andersen CB (1998) Expression of alpha and beta subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads. *Ann Rheum Dis* **57**, 303-308.
- 178 Yu CH, Law JB, Suryana M, Low HY, Sheetz MP (2011) Early integrin binding to Arg-Gly-Asp peptide activates actin polymerization and contractile movement that stimulates outward translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20585-20590.
- 179 Horbinski C, Mojesky C, Kyprianou N (2010) Live Free or Die: Tales of Homeless (Cells) in Cancer. *Am J Pathol* **177**, 1044-1052.
- 180 Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2004) Focal adhesion kinase gene silencing promotes anoikis and suppresses metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells. *Surgery* **135**, 555-562.
- 181 Wu Y, He L, Zhang L, Chen J, Yi Z, Zhang J, Liu M, Pang X (2011) Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **339**, 403-411.
- 182 Brown RV, Gaerig VC, Simmons T, Brooks TA (2013) Helping Eve overcome ADAM: G-quadruplexes in the ADAM-15 promoter as new molecular targets for breast cancer therapeutics. *Molecules* **18**, 15019-34.
- 183 Witters L, Scherle P, Friedman S, Fridman J, Caulder E, Newton R, Lipton A (2008) Synergistic inhibition with a dual epidermal growth factor receptor/HER-2/neu tyrosine kinase inhibitor and a disintegrin and metalloprotease inhibitor. *Cancer Res* **68**, 7083-7089.
- 184 Eliseeva IA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP (2013) Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)* **78**, 1377-1391.
- 185 Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M (1999) An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* **19**, 4552-4560.
- 186 Burgess HM, Richardson WA, Anderson RC, Salaun C, Graham SV, Gray NK (2011) Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. *J Cell Sci* **124**, 3344-3355.
- 187 Jønson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen Tv, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC (2007) Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* **6**, 798-811.
- 188 Dao VT, Dupuy AG, Gavet O, Caron E, de Gunzburg J (2009) Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *J Cell Sci* **122**, 2996-3004.
- 189 Wang Y, Ding SJ, Wang W, Jacobs JM, Qian WJ, Moore RJ, Yang F, Camp DG 2nd, Smith RD, Klemke RL (2007) Profiling signaling polarity in chemotactic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8328-8333.

- 190 Willett M, Flint SA, Morley SJ, Pain VM (2006) Compartmentalisation and localisation of the translation initiation factor (eIF) 4F complex in normally growing fibroblasts. *Exp Cell Res* **312**, 2942-2953.
- 191 Woods AJ, Roberts MS, Choudhary J, Barry ST, Mazaki Y, Sabe H, Morley SJ, Critchley DR, Norman JC (2002) Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem* **277**, 6428-6437.
- 192 Woods AJ, Kantidakis T, Sabe H, Critchley DR, Norman JC (2005) Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. *Mol Cell Biol* **25**, 3763-3773.
- 193 de Hoog CL, Foster LJ, Mann M (2004) RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* **117**, 649-662.
- 194 Brown MA, Wallace CS, Anamelechi CC, Clermont E, Reichert WM, Truskey GA (2007) The use of mild trypsinization conditions in the detachment of endothelial cells to promote subsequent endothelialization on synthetic surfaces. *Biomaterials* **28**, 3928-3935.
- 195 Ranzato E, Grosso S, Patrone M, Betta PG, Viarengo A, Biffo S (2009) Spreading of mesothelioma cells is rapamycin-sensitive and requires continuing translation. *J Cell Biochem* **108**, 867-876.
- 196 Rodriguez AJ, Shenoy SM, Singer RH, Condeelis J (2006) Visualization of mRNA translation in living cells. *J Cell Biol* **175**, 67-76.
- 197 Jia Z, Barbier L, Stuart H, Amraei M, Pelech S, Dennis JW, Metalnikov P, O'Donnell P, Nabi IR (2005) Tumor Cell Pseudopodial Protrusions: Localized Signaling Domains Coordinating Cytoskeleton Remodeling, Cell Adhesion, Glycolysis, RNA Translocation and Protein Translation. *J Biol Chem* **280**, 30564-30573.
- 198 Pestka S (1971) Inhibitors of ribosome functions. *Annu Rev Microbiol* **25**, 487-562.
- 199 Willett M, Pollard HJ, Vlasak M, Morley SJ (2010) Localization of ribosomes and translation initiation factors to talin/beta3-integrin-enriched adhesion complexes in spreading and migrating mammalian cells. *Biol Cell* **102**, 265-276.
- 200 St Johnston D (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-375.
- 201 Medioni C, Mowry K, Besse F (2012) Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development* **139**, 3263-3276.
- 202 Gu W, Pan F, Singer RH (2009) Blocking β -catenin binding to the ZBP1 promoter represses ZBP1 expression, leading to increased proliferation and migration of metastatic breastcancer cells. *J Cell Sci* **122**, 1895-1905.

- 203 Mingle LA, Okuhama NN, Shi J, Singer RH, Condeelis J, Liu G (2005) Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci* **118**, 2425-2433.
- 204 Woods A, Wang G, Beier F (2007) Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* **213**, 1-8.
- 205 Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R (2007) High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17406-17411.
- 206 Stoletov K, Kato H, Zardouzian E, Kelber J, Yang J, Shattil S, Klemke R (2010) Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci* **123**, 2332-2341.
- 207 Gao J, Zheng W, Wang L, Song B (2015) A disintegrin and metalloproteinase 15 knockout decreases migration of fibroblast-like synoviocytes and inflammation in rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep* **11**, 4389-4396.
- 208 Lorenzatti Hiles G, Bucheit A, Rubin JR, Hayward A, Cates AL, Day KC, El-Sawy L, Kunju LP, Daignault S, Lee CT, Liebert M, Hussain M, Day ML (2016) ADAM15 Is Functionally Associated with the Metastatic Progression of Human Bladder Cancer. *PLoS One* **11**, e0150138.
- 209 Dong DD, Zhou H, Li G (2015) ADAM15 targets MMP9 activity to promote lung cancer cell invasion. *Oncol Rep* **34**, 2451-2460.
- 210 Haas C, Aicher WK, Dinkel A, Peter HH, Eibel H (1997) Characterization of SV40 T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol Int* **16**, 241-247.
- 211 Gey G, Coffman W, Kubicek M (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* **12**, 264-265.

5.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Forschungsabteilung der Rheumatologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Harald Burkhardt am Universitätsklinikum Frankfurt der Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Harald Burkhardt für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, hervorragende Arbeitsbedingungen und die Möglichkeit an einem spannenden Thema zu arbeiten.

Frau Prof. Beatrix Süß danke ich dafür die Bereitschaft diese Arbeit seitens des Fachbereichs Biologie an der Technischen Universität Darmstadt zu betreuen und mir bei jeglichen Fragen zur Seite gestanden zu haben.

Herrn Prof. Gerhard Thiel danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, den stetigen Rückhalt und das Engagement.

Für die intensive Betreuung im Labor möchte ich mich bei Frau Dr. Beate Böhm bedanken, die nicht müde wurde dieser Arbeit mit ihren Anregungen den letzten Feinschliff zu geben und die mich während der experimentellen Phase dieser Arbeit fachlich und menschlich immer wieder unterstützt und motiviert hat.

Ich bedanke mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, im Speziellen Dr. Nadine Schneider, Krisitin Krause, Verena Dresing und Dr. Tatjana Scholz für den Beitrag zum guten Laboralltag, ihre Hilfsbereitschaft und die zahlreichen fachlichen und privaten Diskussionen, die auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Bereitstellung humaner Biomaterialien danke ich Frau Prof. Andrea Meurer sowie Frau Dr. Stefanie Adolf (Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim, Frankfurt) und Frau Dr. Michaela Köhm (Rheumatologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Frankfurt). Weiterhin gilt mein Dank Frau Prof. Dagmar Meyer zu Heringdorf für die Einweisung am Konfokalmikroskop und dessen Nutzung.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinen Freunden und meiner Familie. Alena, Anne, Anika, Lisa, Jenny und Susan, danke, dass ihr mich stets motiviert und an mich geglaubt habt. Ein besonderer Dank geht an meine Mutter, die mir stets den Rücken frei gehalten und mich durch so manche Höhen und Tiefen begleitet hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Kollegen bei Abbott, die durch ihre Motivation dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit abschließe.

5.5 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die folgenden wissenschaftlichen Beiträge veröffentlicht, die Teilergebnisse dieser Arbeit enthalten:

Publikation:

Fried D, Böhm BB, Krause K, Burkhardt H (2012) ADAM15 Protein Amplifies Focal Adhesion Kinase Phosphorylation under Genotoxic Stress Conditions. *J Biol Chem* **287**, 21214-21223.

Poster beim DGRh-Kongress 2011 in München mit Posterpreis:

The anti-apoptotic capacity of ADAM15 is dependent on its cytoplasmic domain and its interaction with focal adhesion kinase

Vortrag beim DGRh-Kongress 2011 in München:

The anti-apoptotic capacity of ADAM15 is dependent on its cytoplasmic domain and its interaction with focal adhesion kinase

5.6 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Dorothee Fried

geboren am 14. September 1984 in Darmstadt

BERUFSERFAHRUNG

Seit 08/2015 **Technical Support Scientist** bei Abbott GmbH & Co. KG.
Produktspezialist für Immunoassays (Toxoplasmose und Pepsinogen)
bei Abbott Diagnostics Wiesbaden, Technical Operations.

PROMOTION, STUDIUM UND SCHULE

11/2009-02/2014 **Promotion** im Forschungslabor der Rheumatologie am
Universitätsklinikum Frankfurt bei Prof. Dr. med. Harald Burkhardt mit
dem Thema „Funktion der Disintegrin-Metalloproteinase ADAM15 in der
Pathophysiologie von entzündlichen Gelenkerkrankungen“

10/2004-09/2009 **Biologie-Studium** an der TU Darmstadt, Abschluss: Diplom (sehr gut)
Hauptfächer: Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie, Tierphysiologie
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Gerhard Thiel
(Pflanzenphysiologie – Membranebiophysics) mit dem Thema
„Modifikation und funktionelle Analyse des synthetischen Kaliumkanals
KirBac“

08/2001-06/2004 Gymnasium Gernsheim, Abschluss: Abitur (1,7)

AUSLANDSPRAKTIKA

01/2008-02/2008 Tierphysiologisches Praktikum
Università degli Studi di Milano, Italien, Labor von Prof. Dario
DiFrancesco

09/2007-12/2007 Pflanzenphysiologisches Praktikum
Università degli Studi di Milano, Italien, Labor von Prof. Ida De
Michelis

SONSTIGES

05/2014-07/2014 Freiwilligenarbeit in der Wildtier-Auffangstation Heaven's Wildlife
Rescue. Oil Springs, Ontario, Kanada

5.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den